



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

JOÃO MARCOS LIRA DE MELO

EFEITOS ANTIOXIDANTES DO ÁCIDO ROSMARÍNICO SOBRE
SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA EM MODELO
EXPERIMENTAL DE PARKINSON

VITÓRIA
2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

JOÃO MARCOS LIRA DE MELO

EFEITOS ANTIOXIDANTES DO ÁCIDO ROSMARÍNICO SOBRE
SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA EM MODELO
EXPERIMENTAL DE PARKINSON

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre biotecnologia

Orientadora: Prof^a Dr^a Sonia Alves Gouvea

VITÓRIA

2018

Espaço reservado aos dados internacionais de catalogação, elaborados pela Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo.

JOÃO MARCOS LIRA DE MELO

**EFEITOS ANTIOXIDANTES DO ÁCIDO ROSMARÍNICO SOBRE SISTEMA
RENINA ANGIOTENSINA EM MODELO DE PARKINSON**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Apresentada em 18 maio de 2018.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dra. Sonia Alves Gouvea
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador

Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira
Universidade Federal do Espírito Santo
Examinador Interno

Prof. Dr. Marcelo Perim Baldo
Universidade Estadual de Montes Claros
Examinador Externo

VITÓRIA

2018




UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**"EFEITOS ANTIOXIDANTES DO ÁCIDO ROSMARÍNICO SOBRE SISTEMA
RENINA ANGIOTENSINA EM MODELO DE PARKINSON"**

João Marcos Lira De Melo

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção
do título de Mestre em Biotecnologia.

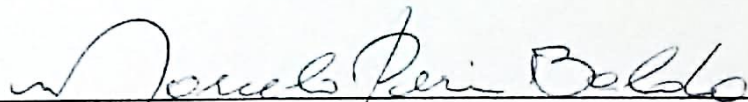
Aprovado por:



Prof. Dra. Sônia Alves Gouvêa (UFES)
Orientadora



Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira (UFES)
Membro Interno



Prof. Dr. Marcelo Perim Baldo (UNIMONTES)
Membro Externo

Vitória - ES, 18 de maio de 2018.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus autor de tudo que conquistei em minha vida pela força e estar comigo todos esses anos de minha vida e por mais esse presente que ele me concedeu

A minha família na figura da, minha mãe, pai e irmãos que estiveram me ajudando todos os anos desse mestrado. Sou grato por todo o apoio e paciência comigo nesses últimos anos difíceis.

A professora Sônia pela oportunidade e confiança que me deu, pela orientação e grande ajuda que recebi da parte dela que permitiram esse trabalho se tornar realidade.

A Sara e a professora Cristina do Laboratório de Neurobiologia Molecular e Comportamental (LNMC), pelas amostras cedidas dos animais do mestrado da Sara e por toda ajuda que sempre prontamente me deram.

Ao João Vitor pela histologia que você para o meu trabalho e todos os conselhos na escrita na metodologia e pela tentativa com fígado mesmo com a pequena chance de dar certo.

A Simone pelo Blot que deixou muitas vezes de fazer suas próprias análises, vinha no final de semana para fazer as análises por causa do prazo eu agradeço mesmo.

Aos vários ICs que me ajudaram nesses dois anos principalmente nos dias de sacrifício e a todos os amigos que pude fazer em quanto estive na UFES, vou carregar esses momentos para o resto de minha vida,

A FAPES pelo apoio financeiro na figura da bolsa que permitiram me manter por esses anos que priorizei a conquista desse título.

obrigado.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Cadeia de reações de formação do ácido rosmarínico em vermelho com enzimas e produtos das reações.....	18
Figura 2 metabolismo do MPTP a MPP+ pela ação da MAO-B	20
Figura 3 Esquema mostrando a oxidação do oxigênio, enzimas que participam e possíveis efeitos nocivo	22
Figura 4 Índice hipertrófico do rim aumentado para o grupo MPTP e normalização dos valores no grupo MPTP/AR	35
Figura 5 Índice hipertrófico do fígado aumentado para o grupo MPTP e normalização dos valores no grupo MPTP/AR.....	35
Figura 6 Índice hipertrófico do coração aumentado para o grupo MPTP e normalização dos valores no grupo MPTP/AR.....	36
Figura 7 Imagens representativas do córtex renal de camundongos dos grupos CON, ÁCIDO ROSMARÍNICO (AR), MPTP e MPTP-AR.	39
Figura 8. Expressão proteica do receptor AT2 no tronco encefálico.	41
Figura 9 Expressão da enzima ECA 1 no tronco encefálico,.....	43
Figura 10 Expressão de superóxido dismutase (SOD) no tronco encefálico,. .	43
Figura 11 Expressão de catalase no tronco encefálico,	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 peso dos órgãos dos grupo 34

LISTA DE ABREVIATURAS

4C4H - Ácido 4-coumaroil-4'-hidroxifenilático

4CL - Ácido 4-coumárico coA-ligase

6-OHDA - 6-hydroxydopamina

AHF - Ácido hidroxil fenilpirúvico

AMPC - Monofosfato cíclico

ANG (1-7) - Angiotensina-(1-7)

Ang I- Angiotensina I

Ang II - Angiotensina II

AR- Ácido rosmarínico

ARS-Ácido rosmarínico sintase

AT₁ - Receptor do tipo 1 de Angiotensina II

AT₂ - Receptor do tipo 2 de Angiotensina II

C4H - Ácido cinâmico4-hidroxilase

C57BL/6 - Linhagem de camundongo de pelagem escura

Ca²⁺- Íon cálcio com duas cargas positivas

CCl₃- Tricloro carbono

CCl₄- Tetracloreto de carbono

COX- Ciclooxigenase

DP - Doença de Parkinson

ECA1 - Enzima Conversora de Angiotensina

ECA2 - Enzima Conversora de Angiotensina 2

ERN - Espécies reativas do nitrogênio

ERO - Espécie reativa do oxigênio

FAL- Fenilalanina amônia liase

Fe²⁺ - Íon ferro com duas cargas positivas

Fe³⁺ - Íon ferro com três cargas positivas

H₂O - Água

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

HPR – Hidroxi fenil piruvato redutase

IP₃-Inositol trifosfato

JAK -Janus Kinase

L• - Radical livre reativo formado a partir de lipídios

LOO• - radical peroxila

MasR - Receptor Mas

MPP⁺ - íon 1-methyl-4-phenylpyridinium

MPPP - 1-methyl-4-phenyl-4-propionpiperidine

MPTP - 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine

NADH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (sigla em inglês)

NADPH - Fosfato dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido (sigla em inglês)

NF-κB - Fator nuclear kappa beta (sigla em inglês)

NO - Óxido nítrico

O₂ - Oxigênio molecular

O₂^{•-} - Radical superóxido

OCT- Optimal cutting temperature compound

OH⁻ - Radical hidroxila

ONOO⁻ - Ânion peroxinitrito

PLC - Fosfolipase C

SRA - Sistema renina angiotensina

RHO - Família de sinalizadores de proteínas G

SOD - Superóxido dismutase

STAT - transdutor de sinal e ativador de transcrição (sigla em inglês)

TAT - Tirosina amino transferase

RESUMO

MELO, J, M Efeitos antioxidantes do ácido rosmarínico sobre sistema renina angiotensina em modelo de Parkinson. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia

O ácido rosmarínico (AR) é o componente químico de plantas muito utilizadas no meio medicinal, como alecrim, salvia, entre outras. Sua capacidade antioxidante é estudada como uma via alternativa natural para o tratamento de diversas doenças, mas o seu efeito sobre o sistema renina angiotensina (SRA) no modelo de Parkinson no sistema nervoso central ainda é pouco conhecido. Diante disso, o presente estudo tem como objetivo averiguar a influência do AR sobre o SRA no tronco encefálico de camundongos da linhagem C57bl/6 afetados pela toxina MPTP. Os animais foram tratados com a toxina MPTP (30 mg/Kg) para indução da doença de Parkinson, sendo que um grupo recebeu a toxina e o outro além do MPTP foi administrado o AR na dose 20 mg/Kg, via oral por 14 dias. Animais controle foram divididos em um grupo CON, outro grupo recebeu somente AR na dose 20 mg/Kg (grupo AR). A avaliação do peso dos órgãos dos animais demonstrou alteração significativa no peso do fígado e alterações histomorfométricas nos rins. A expressão proteica das proteínas antioxidantes (SOD e catalase) não demonstrou diferenças significativas entre os grupos. Não foi observadas diferenças entre os grupos na expressão da ECA1. Observou-se uma redução significativa na expressão do receptor AT2 no grupo MPTP, e houve um aumento significativo no grupo MPTP/AR. Estes resultados mostram um efeito protetor antioxidante e regulador do AR sobre o SRA. Dessa forma os resultados evidenciam que o AR pode ser uma via de estudo promissora para a busca de novos meios de tratamentos para doenças que alteram o sistema renina angiotensina.

Palavra-chave: Ácido rosmarínico. MPTP. Sistema renina angiotensina. Espécies reativas do oxigênio. Tronco encefálico.

ABSTRACT

MELO, J, M Antioxidant effects of rosmarinic acid on renin angiotensin system in Parkinson's model. Dissertation presented to the Biotechnology Postgraduate Program of the Health Sciences Center of the Federal University of Espírito Santo, as a partial requirement to obtain a Master's degree in Biotechnology

Rosmarinic acid (RA) is the chemical component of plants widely used in the medicinal environment, such as rosemary, sage, among others. Its antioxidant capacity is studied as a natural alternative route for the treatment of several diseases, but its effect on the renin angiotensin system (RAS) in the nervous central system model of Parkinson's is still little known. The objective of this study was to investigate the influence of AR on the SRA of C57bl / 6 mice affected by the MPTP toxin in the brainstem. The animals were treated with the MPTP toxin (30 mg / kg) for induction of Parkinson's disease, one group receiving the toxin and the other in addition to MPTP, RA was given at a dose of 20 mg / kg orally for 14 days. Control animals were divided into a CON group, another group received only RA at a dose of 20 mg / kg (AR group). The evaluation of the weight of the organs of the animals showed a significant alteration in liver weight and histomorphometric changes in the kidneys. Protein expression of antioxidant proteins (SOD and catalase) did not show significant differences between groups. No differences were observed between groups in ECA1 expression. However, there was a significant reduction in the AT2 receptor of the MPTP group in relation to the control group, a significant increase of AT2 receptor in MPTP/AR was also seen. These results show a protective and regulatory effect of RA on RAS. Thus, the results show that rosmarinic acid may be a promising pathway for the search of new means of treatments for diseases that alter the renin angiotensin system

Keywords: Rosmarinic acid. MPTP. Renin angiotensin system. Reactive oxygen species, Brainstem.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	6
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
RESUMO.....	11
ABSTRACT	12
1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	28
2.1 Objetivo Geral.....	28
2.2 Objetivos Específicos.....	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1 Aprovação pelo comitê de ética	29
3.2 Animais.....	29
3.4 Western Blot	30
3.4.1 Preparação dos tecidos e quantificação de proteínas.....	30
3.4.2 Eletroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE)	31
3.4.3 Transferência das proteínas.....	31
3.4.4 Incubação dos anticorpos	31
3.5 Histologia do rim	32
4 ANALISE ESTATÍSTICA	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5.1 Peso corporal e peso de fígado, rim e coração	33
5.2 Histologia do rim	36
5.3 Expressões proteicas do receptor AT1 e AT2	40
5.4 Expressão proteica de ECA1, SOD e Catalase	42
.....	43

6 CONCLUSÃO.....	45
7 REFERÊNCIAS.....	46

1 INTRODUÇÃO

A substituição de produtos sintéticos por produtos naturais é uma tendência cada vez mais crescente no mundo moderno. O uso de produtos naturais em detrimento aos industrializados cresce a cada ano, levado por uma crença de que esses produtos de origem totalmente natural não têm efeitos maléficos no corpo. A sociedade humana demanda cada vez mais por produtos produzidos a partir desse conceito de “natural”, buscando cada vez mais substitutos naturais para produtos industriais tradicionais como alimentos e principalmente medicamentos (KHAN 2018;SLAMENOVA et al., 2002).

O ácido rosmarínico (AR) vem se apresentando como uma substância importante devido aos efeitos benéficos conhecidos no meio popular e muito estudado no meio acadêmico. O AR possui benefícios anti-inflamatórios e antioxidantes. Também aumenta a produção da prostaglandina E2 e reduz a produção do leucotrieno B4 em leucócitos humanos (WU; WANG, 2012). Então, plantas com AR possuem potencial terapêutico no tratamento ou prevenção de asma brônquica, úlcera péptica, doenças inflamatórias (gingivite, por exemplo), hepatotoxicidade, arteriosclerose, isquemia, doenças cardíacas, catarata, câncer, diabetes (reduz a glicemia). Sua absorção pode ser pelo intestino ou através da pele (GAMARRO;2012).

O AR é um composto fenólico formado por um éster do ácido cafeico e pelo ácido 3,4-dihidroxifeniláctico (SHEKARCHI et al., 2012a). Presente em espécies vegetais comuns como o alecrim (*Rosmarinus officinalis*), onde foi encontrado pela primeira vez por Scarpati e Oriente em 1958 (AL-DHABI et al., 2014; SCARPATI; ORIENTE,1958; SCHECKEL; DEGNER; ROMAGNOLO, 2008).

Estudos de taninos de plantas labiateas sp. começaram a ser feitos nos anos cinquenta e o AR foi descoberto em 1958, a partir de extratos do alecrim, *Rosmarinus officinalis* L., ganhando seu nome derivado do nome científico desse vegetal (PETERSEN et al., 2009). A variedade de exemplares de plantas documentadas como possível fonte do ácido é muito grande sendo que as mais citadas são laminaceas e borragináceas, mas estudos mostram que também

pode ser encontrado em outros gêneros vegetais, como exemplo pode-se citar plantas da família rubiaceae (AQUINO et al., 1990), zosteraceae (ACHAMLALÉ; REZZONICO; GRIGNON-DUBOIS, 2009), cannaceae (SOOK YUN et al., 2004), onagraceae (HUANG et al., 2007), salvia (*Salvia officinalis*), Spearmint (*Mentha* sp), e *Melissa officinalis*, e em plantas usadas na medicina Chinesa tradicional, como a *Perilla frutescens*, *Salvia miltiorrhizae* *Rabdosia rubescens* (AMOA et al., 2016a; SHEKARCHI et al., 2012b). O AR encontra-se em muitas outras espécies de plantas, destacando-se: *Glechoma hederacea* (erva-terrestre), *Lavandula angustifolia* (lavanda), *Lippia alba* (erva cidreira, chá de tabuleiro), *Lippia graveolens* (orégano mexicano), *Lippiaoriganoides* (salva de Marajó), *Majorana hortensis* (manjerona), *Mentha arvensis* (hortelã), *Mentha piperita* (hortelã pimenta), *Mentha spicata* (hortelã-peluda) (AYRANCI; ERKAN, 2013; PETERSEN; SIMMONDS, 2003; SALTAS et al., 2013).

O ácido tem sido estudado por diversas áreas por seu conhecido efeito antioxidante (JIANG et al., 2013). A combinação das duas porções catecol, que confere uma polaridade adequada para permitir a penetração do ácido pela camada lipídica, juntamente com os quatro hidrogênios fenólicos da molécula é que demonstram uma capacidade de sequestro de radicais livres (FADEL; EL KIRAT; MORANDAT, 2011; GIL; ENACHE; OLIVEIRA-BRETT, 2013). Apesar do efeito antioxidante do AR ser bastante conhecido a maneira como esse efeito acontece ainda é pouco elucidada, há estudos que demonstram que ele age como um removedor de espécies reativas de oxigênio (EROs), principalmente de radicais livres derivados de reações endógenas como superóxidos e elétrons livres das mitocôndrias gerados na cadeia transportadora de elétrons (BAKOTA et al., 2015; NICOLAI et al., 2016; OLUGBAMI; GBADEGESIN; ODUNOLA, 2015). Tem sido documentado efeito anti-inflamatório pela inibição da COX (Ciclooxygenase) 1 e 2 (SCHECKEL; DEGNER; ROMAGNOLO, 2008).

A biossíntese do AR (Figura 1) foi estudado pela primeira vez em hortelã pimenta (*Mentha piperita*) e hortelã brava (*Mentha arvensis*) (ELLIS; TOWERS, 1970), mas foi elucidado em estudos com a planta *Coleus blumeus benth* (PETERSEN et al., 1993, 1994) como uma via geral do fenilpropanóide com o hidroxicinamoil, o substrato aceptor do hidroxicinamoil vem da via do ácido chiquimico. O

aminoácido aromático fenilalanina e l-tirosina são transformados em seus precursores 4-coumaroil-coA e ácido 4-hidrofenilático. As enzimas que catalisam a fenilalanina são da via do fenilpropanóide, fenilalanina amônia liase (FAL), ácido cinâmico 4- hidroxilase (C4H) e ácido 4-coumárico coA- ligase (4CL). A tirosina sofre desaminação pela tirosina aminotransferase (TAT) formando então ácido hidroxifenilpirúvico (AHF) e dois oxaglutato como cosubstratos. O ácido hidroxifenilpiruvico é reduzido para ácido hidroxifenilático pela enzima hidroxifenilpiruvato redutase (HPR). Os intermediários das reações da fenilalanina e tirosina se ligam por ligação éster formando então o ácido 4-coumaroil-4'-hidroxifenilático (4C4H) liberando também a coA, essa reação é catalisada pela enzima "ácido rosmarínico sintase" (ARS - 4-coumaroil coA:4'-hidroxifenilático ácido 4 coumaroiltransferase). Grupos hidroxil 3 e 3' são introduzidos por reações de monooxigenase. O ácido 4-coumaroil-4'-hidroxifenilático sofre ação de enzimas hidroxinamoil -4'- hidroxifenilato 3' hidroxilase para o grupamento hidroxil 3' e 4- coumaroilhidroxifenilato 3-hidroxilase para o grupamento hidroxil 3 (MATSUNO et al., 2002; PETERSEN, 1997; PETERSEN et al., 2009). Das enzimas que são estudadas como participantes da via de formação do AR 3 delas a saber FAL, C4H e 4CL participam também da via geral do fenilpropanóide e 4 são específicas da biossíntese do ácido rosmarínico (PETERSEN; SIMMONDS, 2003).

Os vários estudos com vegetais contendo concentrações de AR vem sendo feitos pelas diversas propriedades farmacológicas e biológicas conhecidas (AMOA et al., 2016b). Estudos tem demonstrado que pacientes hipertensivos não tratados tem uma redução na SOD e glutathione peroxidase que está inversamente correlacionado com a pressão sanguínea (BARADARAN; NASRI; RAFIEIAN-KOPAEI, 2014). Estudos hipotetizam uma possível correlação entre hipertensão arterial e aumento de ERO no organismo (ARDALAN; RAFIEIAN-KOPAEI, 2014). Esse efeito hipertensivo pode estar ligado ao Sistema Renina Angiotensina (SRA), devido ao seu papel na homeostase do sódio, influenciado por radicais livres (CHUGH; LOKHANDWALA; ASGHAR, 2011; LUO et al., 2015). Devido a isso a ação antioxidante do AR pode ser eficaz na regulação dos componentes do SRA, principalmente a ação da Ang II (FERREIRA et al., 2018).

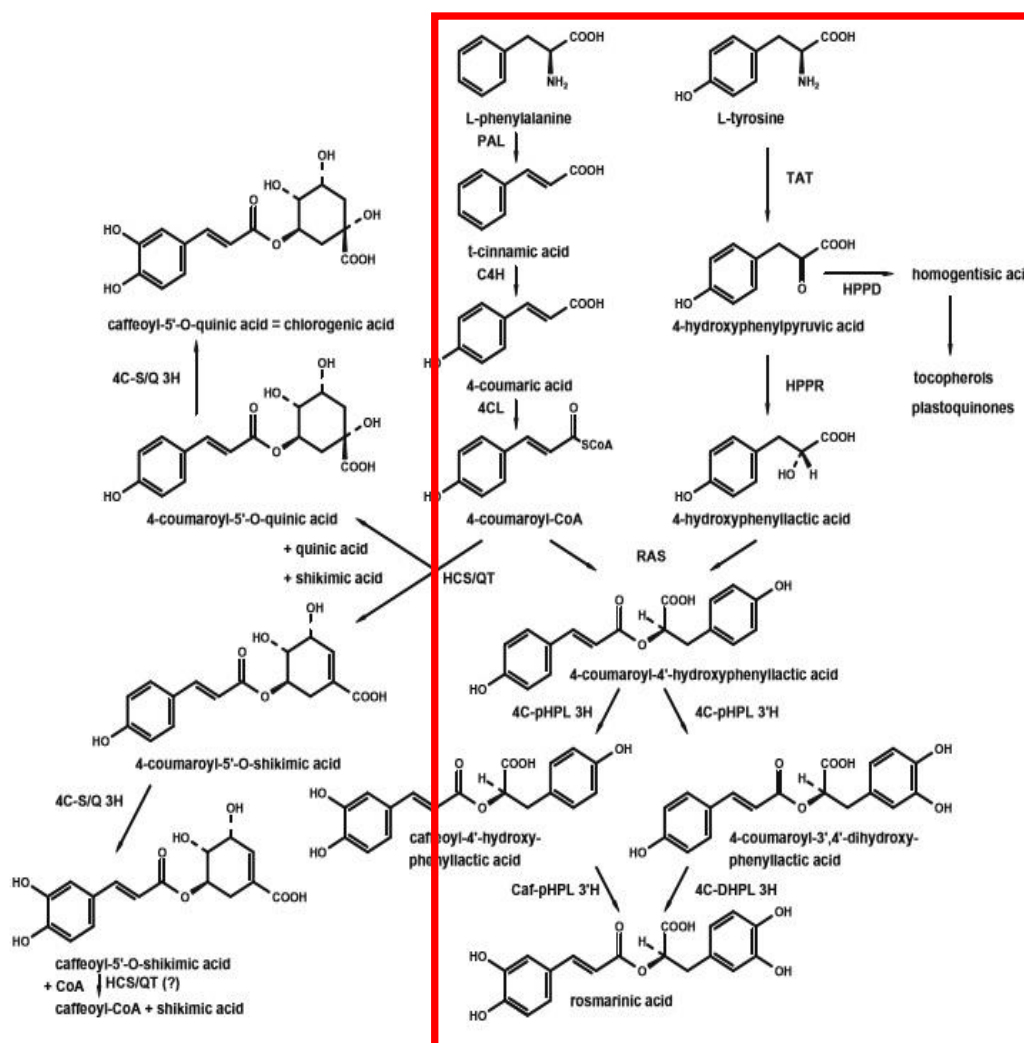


Figura 1 Cadeia de reações de formação do ácido rosmarínico em vermelho com enzimas e produtos das reações (PETERSEN et al., 2009)

A capacidade antioxidante do AR tem chamando atenção para sua utilização em doenças que tem alguma ligação com ERO como doenças neurodegenerativas (ALKAM et al., 2007; SHIMOJO et al., 2009; WANG et al., 2012) ou mesmo em doenças devido aos sistemas do corpo que sofrem alguma influência de radicais livre (FERREIRA et al., 2018; POPOV et al., 2016; WANG et al., 2017).

Uma doença que tem aumentado sua incidência nos últimos anos, descrita como neurodegenerativa é a doença de Parkinson (DP). Podendo ser utilizada como alvo o uso de novas terapias como AR que reduzem as ERO que estão alteradas na DP.

A DP é considerada a segunda doença neurodegenerativa mais comum do Sistema Nervoso Central (SNC) e atinge todas as classes sociais e grupos

étnicos (LEBOUVIER et al., 2009), sendo o principal fator de risco a idade avançada. Estudos mostram que há um aumento de incidências na faixa etária entre os 55 a 60 anos (TWELVES; PERKINS; COUNSELL, 2003).

A DP consiste, resumidamente, na morte dos neurônios dopaminérgicos da substância negra no cérebro e posterior diminuição da concentração de dopamina, o que leva ao aparecimento dos sintomas da DP (GOETZ, 2011; RASCOL et al., 2011). Apesar de documentos antigos da China e Índia relatarem doenças com sintomas parecidos com DP, foi James Parkinson, em 1817, que descreveu a doença (GOETZ, 2011). Vários estudos tem mostrado que a DP está relacionada a queda das taxas de dopamina (FAHN, 2015; LEES; TOLOSA; OLANOW, 2015; RASCOL et al., 2011).

Os principais sintomas do Parkinson são motores e caracterizam a doença conhecida como síndrome parkinsoniana (MASSANO; BHATIA, 2012). Sintomas como Bradicinesia que se caracterizam pela lentidão dos movimentos e perda progressiva da amplitude na tentativa de fazer movimentos alternados de partes do corpo. Observa-se também tremor em repouso sendo um movimento rítmico e oscilatório que afeta partes do corpo que estão apoiados por uma superfície. Rigidez caracteriza-se por um aumento do tônus muscular (GOETZ, 2011). Pacientes com DP também tendem a apresentar uma postura encurvada com passos curtos e próximos. Apesar desses sintomas serem usados na clínica para diferenciar o diagnóstico de DP, entre outras doenças degenerativas, pode-se citar sintomas não motores como ansiedade, disfunção urinária, constipação, insônia, e diminuição da percepção de movimento (ELBAZ; MOISAN, 2008).

Desta forma, com o envelhecimento da população e o provável aumento da ocorrência da DP, faz-se necessário estudos com modelos experimentais que simulem as alterações que ocorrem nos indivíduos afetados.

A toxina MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) é uma das quatro principais drogas utilizadas para induzir a morte de neurônios dopaminérgicos nigroestriatais do cérebro (BARANYI et al., 2016; PORRAS; LI; BEZARD, 2012) e simula a doença de Parkinson (DP) em humanos, primatas e camundongos (INNAMORATO et al., 2010). Como via de exemplo as outras 3 são 6-hydroxydopamina (6-OHDA), rotenona, e paraquat (BOVÉ et al., 2005).

O MPTP é altamente lipofílico, como consequência atravessa a barreira hematoencefálica ligando-se a lisossomos de astrócitos. Nessas células o MPTP é convertido em seu metabólico tóxico o íon 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) pela oxidação da monoaminoxidase B (MAO-B) (RANSOM et al., 1987). É interessante citar que o MPP⁺ não destrói diretamente neurônios dopaminérgicos, pois não atravessa a barreira hematoencefálica como o MPTP (Figura 2). O MPP⁺ é um excelente substrato para o receptor de dopamina das células dopaminérgicas o que pode explicar sua seletividade. O efeito ainda não está bem elucidado mas sabe-se da ação do MPTP nas mitocôndrias pela inibição do complexo 1 da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (BARANYI et al., 2016; MEREDITH, 2011). Essa inibição gera formação de radicais livres devido a incompleta redução do oxigênio na cadeia transportadora de elétrons, podendo gerar EROS nocivos como superóxidos e peróxidos pela superóxido dismutase na reação de Fenton na presença de ferro (CASTELLANI et al., 1996; INNAMORATO et al., 2010).

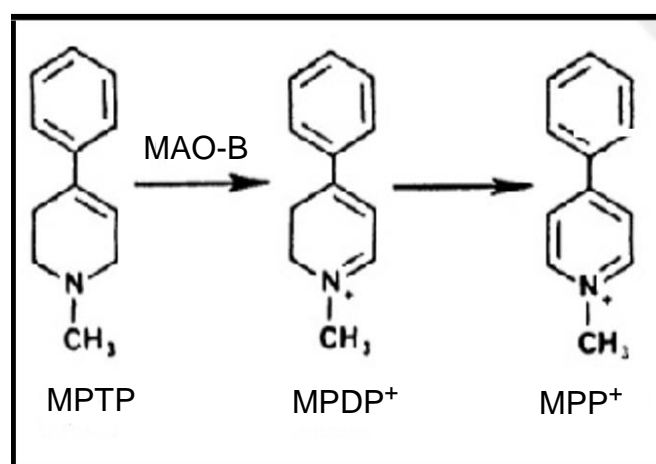


Figura 2 metabolismo do MPTP a MPP⁺ pela ação da MAO-B (modificado de Kopin 1987)

As EROs são compostos gerados como resultado das reações de oxidação redução do oxigênio, também pode ser gerado em reações posteriores de produtos dessas reações, são moléculas altamente reativas que apresentam um elétron desemparelhado no orbital externo da camada de valência tornando essas moléculas capazes de reagir com diversas outras estruturas moleculares (LOBO et al., 2010).

Os substratos dessas reações podem ser desde lipídios até proteínas e ácidos nucleicos. Os radicais são formados quando o último orbital fica desemparelhado

num cenário de oxirredução onde essas moléculas reativas podem sofrer redução de outras moléculas ou reduzir outras moléculas e produzir novos radicais livres (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

De fato, nem todas as moléculas conhecidas como radicais livres tem elétrons desemparelhados apesar de sofrerem reações de oxirredução e produzirem radicais livres como produto final em suas reações ou em reações intermediárias. Essas reações de oxirredução ocorrem em etapas e durante essas etapas pode haver o aparecimento de radicais livres o que acontece com frequência na presença de oxigênio molecular (O_2) (BIRBEN et al., 2012). Moléculas derivadas do oxigênio como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) apesar de não ter elétrons desemparelhados produzem radicais livres em reações intermediárias, o peróxido, por exemplo, produz o radical hidroxila (OH^\cdot) reagindo com metais de transição como cobre e ferro (APRIOKU, 2013).

EROs podem ser formados por diversas fontes in vivo dentre elas podemos citar: auto oxidação, fotoquímica e enzimas também podem estar envolvidos com substâncias endógenas como xenobióticos. A variedade de enzimas envolvidas na produção de EROs pode ser desde enzimas do citocromo p450 como também oxidases, lipooxigenases, peroxidases e desidrogenases (KEHRER, 2000).

O oxigênio molecular é o principal produtor de radicais livres nas células. Na respiração celular o oxigênio é reduzido recebendo 4 elétrons, mas para isso esses elétrons são passados em reações intermediárias uma a uma podendo durante essas reações haver surgimento de espécies reativas do oxigênio. Nas reações o oxigênio molecular é reduzido ao radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) com ganho de 1 elétron, o $O_2^{\cdot-}$ é então reduzido pelo segundo elétron originando H_2O_2 que é reduzido pelo terceiro elétron originando uma molécula de água (H_2O) e um radical hidroxila (OH^\cdot) este é reduzido pelo quarto elétron formando assim a segunda molécula de água (SARSOUR et al., 2010). Essas reações ocorrem nas mitocôndrias e os elétrons vem da cadeia transportadora de elétrons. O radical superóxido é oxidado na presença da enzima SOD (superóxido-dismutase) em H_2O_2 que é convertido em duas moléculas de água pela enzima catalase (figura3). O peróxido de hidrogênio também pode ter sua oxidação a 2 moléculas

de água e glutathiona oxidada catalisada também pela enzima glutathiona peroxidase (COTRAN, 2000; SARSOUR et al., 2010)

O Peróxido de hidrogênio é extremamente deletério, pois em sua reação produz o radical hidroxila que tem facilidade para atravessar a membrana plasmática e demais membrana. Ele é formado a partir da dismutação do $O_2^{\cdot -}$, também pode ser formado, através da ação de oxidases, e neutralizado pela enzima catalase (figura3) (COTRAN, 2000). O radical hidroxil pode ser formado numa reação com o peróxido de hidrogênio, reação de Haber-Weiss. O H_2O_2 pode reagir também com metais de transição como ferro ou cobre e formar o radical hidroxil, reação de fenton.

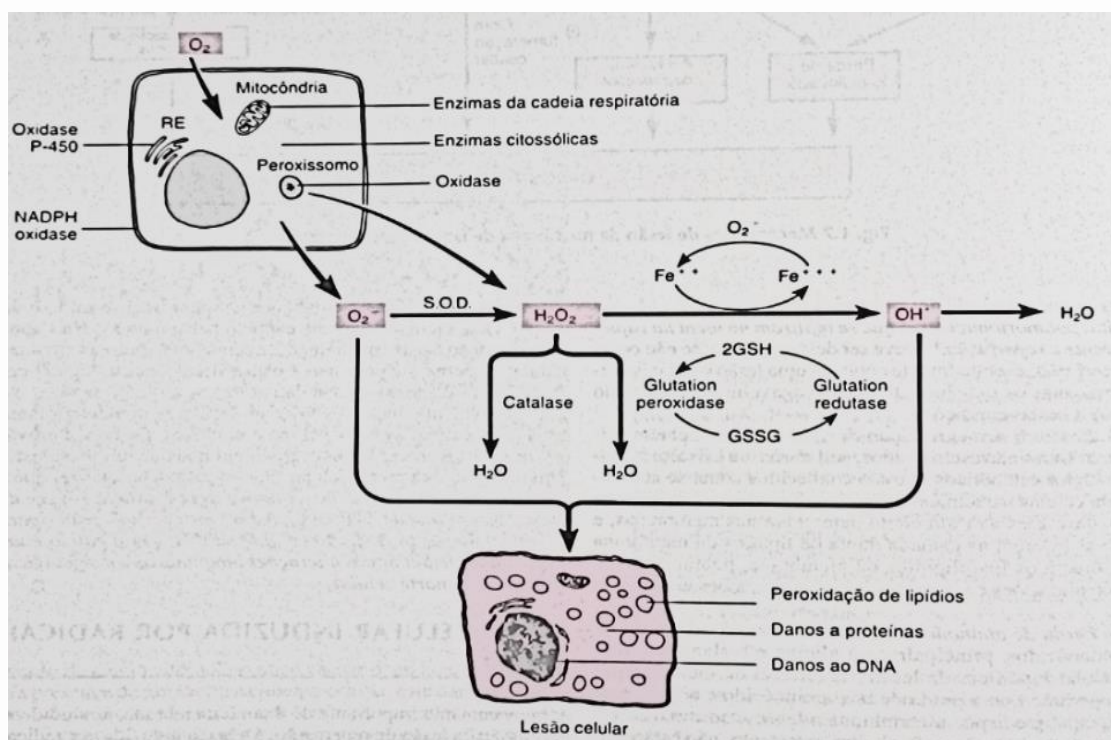


Figura 3 Esquema mostrando a oxidação do oxigênio, enzimas que participam e possíveis efeitos nocivo (COTRAN, 2000)

Apesar das EROs terem maior relevância biológica existem outras espécies reativas, como as espécies reativas do nitrogênio (ERN). As principais são o óxido nítrico (NO) e o ânion peroxinitrito ($ONOO^-$). O tetracloreto de carbono (CCl_4) é uma espécie reativa centrada no carbono e sua reação produz um radical tóxico ligado a peroxidação de lipídios o tricloro carbono (CCl_3) (APRIOKU, 2013; COTRAN, 2000).

Como já foi citado radical livre é toda espécie química com elétron desemparelhado na camada mais externa (LOBO et al., 2010). Devido a essa característica, radicais livres sejam EROs e ERN podem reagir com praticamente todos os componentes celulares como lipídios, proteínas, ácidos nucleicos (VASCONCELOS et al., 2007).

As reações geralmente oxidativas ocorrem em cadeias com várias etapas e são produzidos mais radicais livres, podendo gerar um dano tecidual geralmente devido a oxidação aos componentes celulares. Quando a produção de espécies reativas excede a capacidade do corpo de neutralizá-los, se instala uma condição conhecida como estresse oxidativo para derivados do oxigênio e para os derivados do nitrogênio, conhecido como estresse nitrosativo (APRIOKU, 2013; BARBOSA et al., 2010).

O estresse oxidativo nas células do sistema imune tem um papel importante, pois os macrófagos e neutrófilos utilizam a alta produção de EROs para fagocitar os microrganismos (ANAS et al., 2010). Hepatócitos utilizam EROs para desintoxicação (WEBSTER; NUNN, 1988), radicais livres podem bloquear a produção de prostaglandinas como tromboxano A₂ (PACHER; BECKMAN; LIAUDET, 2007; WEBSTER; NUNN, 1988).

Contudo o dano surge quando há o desequilíbrio e o organismo não mais consegue controlar a quantidade produzida e o malefício pode acontecer em diversas estruturas da célula, como nas membranas plasmáticas onde lipídios poli-insaturados sofrem ataque de radicais livres que transfere um elétron para essa molécula formando um radical livre reativo (L•) (CORDEIRO, 2014; VLADIMIROV, 1987).

Estudos tem demonstrado que EROs e ERN tem importante função na regulação dos barorreceptores, por influência da Ang II através dos seus receptores AT₁ e AT₂ presentes no seio carotídeo e arco aórtico (DE QUEIROZ; MONTEIRO; BRAGA, 2013). EROs participam ativamente nas alterações da pressão arterial mediada por Ang II (DE QUEIROZ; MONTEIRO; BRAGA, 2013).

O SRA está presente em todo sistema nervoso central (TSUDA, 2012). SRA também é encontrado em grande quantidade no tronco encefálico principalmente em áreas do Bulbo responsáveis pela regulação da pressão arterial, núcleo do trato solitário e rostro ventrolateral (ALLEN et al., 1998; AVERILL; DIZ, 2000) promovendo um up-regulation ou down-regulation dependendo de sua via de sinalização. Se houver uma ação no eixo ECA-Ang II- AT₁ há um aumento de liberação de neurotransmissores principalmente noradrenalina levando um aumento da pressão arterial (ALLEN et al., 2006; DAMPNEY et al., 2007), contudo se a ação acontecer pelo eixo ECA2-MasR há uma contrarregulação, ou seja, um efeito contrário ao eixo ECA-Ang II- AT₁ com vasodilatação, natriurese, um aumento do sistema bradicinina-NO (óxido nítrico) e também um aumento da sensibilidade dos barorreceptores (IWAJ; HORIUCHI, 2009; LAZARONI et al., 2012).

O tronco cerebral ou encefálico é uma estrutura localizada entre a medula e o diencéfalo é formado por três estruturas o bulbo, ponte e mesencéfalo. A substância branca do tronco encefálico recebe informações do corpo endereçadas ao cérebro e também envia do cérebro comandos para o corpo. Há ainda núcleos de neurônios difusos nessa substância branca formando massas de substância cinza e são responsáveis pela respiração e circulação sanguínea. (NIEUWENHUY, 2011).

O bulbo também conhecido como bulbo raquidiano e medula oblongata tem a forma de pirâmide e sua parte menor se liga continuamente a medula espinhal não se tem uma divisão visível por isso considera-se que o limite entre eles está em um plano horizontal que passa imediatamente pelo filamento radicular mais cranial do nervo cervical na altura do forame magno (JOTZ G. ; MARRONE A. C. ; STEFANI M.; BIZZI; J. W. ; AQUINI M., 2017). O centro respiratório, importante área responsável pela manutenção das pressões de oxigênio e gás carbônico sanguíneo em níveis adequados, localiza-se no bulbo. O centro vasomotor faz parte também do bulbo e faz o controle da contração vascular e frequência cardíaca, por isso uma lesão nesse órgão pode ser grave. No bulbo também está presente o centro de vômito (CRAVO et al., 2009).

A ponte é uma protuberância anelar, está entre o bulbo e o mesencéfalo. Tem importante papel juntamente com o bulbo na regulação da respiração é também o centro de transmissão de impulsos para o cerebelo e atua como passagem de fibras nervosas que ligam o cérebro a medula (MACHADO; HAERTEL, 2014).

O mesencéfalo está localizado numa direção oblíqua para cima e para frente e está sobre a ponte e abaixo do diencefalo, liga os dois corpos mamilares do diencefalo a comissura posterior. A função é fazer a ligação do mesencéfalo ao córtex cerebral (BARKOVICH; MILLEN; DOBYNS, 2009).

A ativação do SRA acontece quando a concentração de plasma e o fluxo renal diminuem, nisso as células justaglomerulares convertem pró-renina em renina, que é secretada diretamente na circulação. Essa renina no plasma age sobre uma alfa-2-globulina produzida no fígado e tecido adiposo (MANRIQUE et al., 2009) conhecido como angiotensinogênio, sofre uma proteólise sendo convertido em um decapeptídeo chamado Ang I. A partir da ação ECA, que se encontra em células endoteliais por todo o corpo, é clivado 2 aminoácidos dessa Ang I formando o octapeptídeo Ang II (SPARKS et al., 2014), potente vasoconstritor. A Ang II também estimula a secreção de aldosterona pelo córtex das glândulas adrenais. Anormalidades desse sistema pode levar a um aumento excessivo da pressão, disfunções renais e diabetes podendo causar também vários outros efeitos nocivos (MANRIQUE et al., 2009).

Há um equilíbrio do sistema pelo corpo entre sua função efetiva e uma ação regulatória sobre essa função. A ativação do SRA pode acontecer por uma queda de volume sanguíneo, também por queda da pressão arterial interpretada nos barorreceptores. A formação aumentada da Ang II pode elevar a pressão auxiliando assim a restabelecer a normalidade da pressão e ou do volume extracelular pela reabsorção maior de sódio e água através da secreção de aldosterona, constrição das arteríolas eferentes renais ou reabsorção diretas nos túbulos eferentes renais (SPARKS et al., 2014).

A conversão da Ang I em Ang II pela ECA, embora lenta no plasma sua eficiência in vivo é devido estar presente na membrana plasmática luminal das células do endotélio por toda a circulação (PEACH, 1977; RAHIMI; MORADI; NASRI, 2014; SPARKS et al., 2014). Uma carboxipeptidase que tem relação com

a ECA foi descoberta independentemente por dois grupos de pesquisadores e foi denominada como ECA 2. A versão humana dessa enzima é formada por 805 aminoácidos contendo um único domínio catalítico, mas parecido com os dois domínios catalíticos da ECA, tem preferência pela Ang II retirando 1 aminoácido para converter em Ang (1-7). Ela age também sobre Ang I retirando também 1 aminoácido convertendo em Ang (1-9). A ECA 2 regula os níveis e inibe os efeitos da Ang II convertendo-a em Ang (1-7), essa se liga ao receptor Mas (MasR), obtendo assim respostas vasodilatadoras e antiproliferativas. Os efeitos da ECA 2 e a sua importância fisiológica ainda não foram bem elucidados acredita-se que ela age em contrarregulação aos efeitos da ECA. Há outras enzimas inespecíficas conhecidas genericamente por antensinasas termo que inclui aminopeptidases, endopeptidases, carboxipeptidases que degradam as angiotensinas (LIU; HAKUCHO; FUJIMIYA, 2015). Os receptores mais comuns participantes do SRA são os receptores AT₁, AT₂, também algumas angiotensinas se ligam a outros receptores como receptor MasR muito presente no sistema nervoso central. Os receptores de angiotensina ativam uma gama de reações de sistemas de transdução de sinais para alcançar um efeito. O receptor AT₁ com sete regiões transmembrana pertence a superfamília dos receptores que se ligam a proteínas G (GRIENDLING; MURPHY; ALEXANDER, 1993). Os receptores AT₁ acoplam em vários tipos de proteínas G heterodiméricas como a G_q, G_{12/13} e G_i. Através da via JAK/STAT a angiotensina pode regular diversos produtos gênicos relacionados com o crescimento e produção de produtos da matriz extracelular. Os receptores AT₁ tem uma ação na membrana de ativação de NADH/NADPH oxidase, gerando assim ERO (LOPEZ et al., 2003). Essas espécies reativas podem influir bioquimicamente em diversos locais na célula como ativação da MAP-ciclase, tirosina cinase e fosfatases, inativação de NO e a expressão também de proteínas quimioatraentes de monócitos. Os receptores têm também efeitos fisiológicos que são mais conhecidos sobre a função renal, pressão arterial, inflamação e hipertrofia cardíaca. Essas respostas a Ang II são específicas de cada tecido, podendo ser alterada até mesmo com a presença de outros receptores como receptores de bradicinina B₂ que pode se heterodimerizar com AT₁ (ABDALLA et al., 2001).

Os receptores AT₂ tem sua função menos conhecida, entretanto além de sua função contrarregulatória que exerce sobre o receptor AT₁ também é conhecido algumas outras atividades atribuídas ao receptor AT₂. Sua ação também ativa vias de proteína G, com ativação de fosfatases e fosfoproteínas, canais de potássio e induz produção de NO nas células do músculo liso cardíaco. Há também ativação de GMP cíclico e bradicininas, e inibição de canais de cálcio. O AT₂ pode ligar-se diretamente ao receptor AT₁ e antagonizá-lo e aumentar a produção de NO pela heterodimerização com receptores B₂ de bradicinina. A ativação dos receptores AT₂ pode também inibir a via de sinalização NF-κB e JAK/STAT sendo umas das vias ativadas pelo receptor AT₁ (DE QUEIROZ; MONTEIRO; BRAGA, 2013).

Baseado na observação das múltiplas atividades biológicas do AR em modelos in vitro e in vivo, especialmente sua capacidade antioxidante, nossa proposta é investigar os efeitos do tratamento no modelo DP sobre componentes do SRA presentes no tronco encefálico de camundongos induzidos a DP por MPTP.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do tratamento crônico com ácido rosmarínico sobre o sistema renina angiotensina em modelo experimental induzido por MPTP.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar as funções da administração do AR sobre os órgãos coração, fígado e rim;

Avaliar possível alteração de peso do animal medindo o peso corporal final;

Avaliar possíveis lesões causadas pelo MPTP em corte histológico de rim;

Analisar a alteração da expressão dos receptores AT1 e AT2 causadas pela exposição a toxina MPTP;

Avaliar se houve alteração da expressão da enzima ECA 1;

Analisar se aconteceu ou não possível ação protetora das enzimas SOD e CATALASE pela alteração de sua expressão.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Aprovação pelo comitê de ética

Os protocolos experimentais foram aprovados CEUA da UFES (protocolo 60/2016). Foram respeitados os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, www.cobea.org.br), estando de acordo com as normas internacionais de pesquisa envolvendo animais.

3.2 Animais

Foram utilizados 56 camundongos da linhagem C57BL / 6 (9-12 semanas de idade), pesando 25-30 g.

Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno (38 cm x 20 cm x 13 cm) com piso coberto com serragem sob ciclo de 12/12 h luz/escuro, com temperatura ambiente controlada (21-22°C) e com água e ração *ad libitum*. Permaneceram durante todo o tratamento no biotério do Laboratório de Neurobiologia Molecular e Comportamental (LNMC) da UFES.

Os camundongos foram separados aleatoriamente em 4 grupos distintos:

(CON) Controle/salina;

(AR) Ácido Rosmarínico*/veículo (salina+ tween 5%)

(MPTP) MPTP/solução salina;

(MPTP + AR) MPTP /AR.

* O AR (Sigma-Aldrich, CAS 20283-92-5) foi administrado oralmente por sonda intragástrica por 14 dias na dose 20 mg/kg, uma hora antes do MPTP ou injeção de solução salina (CON).

3.3 Modelo da Doença de Parkinson

O MPTP (Sigma-Aldrich, cat M0896) foi dissolvido em solução salina (0,9% NaCl) a 30 mg/kg de base livre. A droga foi administrada uma vez ao dia, por 5 dias consecutivos, via intraperitoneal (HILARIO et al., 2016; MORAES et al., 2016).

Após 72 horas da última administração do MPTP, os animais passaram por testes comportamentais: avaliação de atividade locomotora em campo aberto (rotarod), teste de força/firmeza (Grip strength test) e teste de poste (Pole test). Essa avaliação consistiu em verificar a coordenação motora por testes que são mais usados (DUNHAM; MIYA, 1957; OGAWA et al., 1985; ROZAS; LABANDEIRA GARCÍA, 1997).

Ao final de 14 dias de tratamento com AR e os testes comportamentais, os animais eram sacrificados por guilhotina, e dissecados o coração, rins, fígado e o tronco encefálico. Todos os animais e órgãos foram pesados ao final do experimento em balança analítica. Foi realizada a relação de peso úmido do órgão pelo peso corporal. Os órgãos foram armazenados em freezer -80°C até o momento das análises.

3.4 Western Blot

3.4.1 Preparação dos tecidos e quantificação de proteínas

Nos troncos encefálicos dos camundongos dissecados foi utilizado Western blot para medir a expressão das proteínas AT1, AT2 ECA1, SOD e CATALASE. Foi utilizado 1000 µL de tampão de lise (10mM Tris – HCl pH 7,4, 1mM NaVO₃, 1% SDS, 0,5mM DTT, 5 mM EDTA, 1mM PMSF). A homogeneização primeiramente foi feita utilizando um bisturi e continuada com o uso de um sonicador ultrassônico e posterior centrifugação à 20000 RPM, 4°C por 20 minutos. Após foi recolhido o sobrenadante como extrato bruto de proteínas.

A determinação da concentração de proteínas foi feita utilizando o método de Bradford (BRADFORD, 1976) utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão de acordo com o protocolo estabelecido (ERNST; ZOR, 2010).

3.4.2 Eletroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE)

50 µg das amostras foram carregadas em géis de SDS-poliacrilamida 10% para AT1, AT2 ECA1, SOD e Catalase (1,5 M Tris HCl pH: 8.8, acrilamida 40%, glicerol 100%, SDS 10%, APS 10% e Temed) antes imersos em um tampão para eletroforese (25mM de Tris HCl, 190 mM de glicina e 0,1% de SDS). Previamente a sua aplicação no gel as amostras foram aquecidas a 100 °C durante 5 min. A eletroforese foi conduzida com o tampão (25 mM de tris-HCl pH 8,3, 192 mM de glicina e 0,1% de SDS), a 80 volts por aproximadamente 2 horas e 30 minutos (PowerPac™ HC, BioRad, Singapura). Os procedimentos da eletroforese foram feitos segundo Laemmli (1970).

3.4.3 Transferência das proteínas

Após separadas, as proteínas das amostras foram transferidas para uma membrana de PVDF para avaliação da expressão das proteínas AT1, AT2 ECA1 e SOD-CATALASE. Para a transferência foi utilizada uma cuba molhada (Biorad), por 2:00hs, 60 volts a 4°C, com tampão de transferência constituído de 25 mM de tris-HCl pH 8,3, 192 mM de glicina e 20% (v/v) de metanol.

3.4.4 Incubação dos anticorpos

As membranas de PVDF incubaram por 2:30 horas, após a transferência, em solução composta de leite em pó desnatado (5%) em tampão TBS-tween 0,1% (20 mM de tris-HCl pH 7,4 e 150 mM de NaCl), à temperatura ambiente sob agitação leve, evitando assim ligação não específicas com reativos não imunológicos. As membranas foram incubadas por 4 horas com anticorpos monoclonais de rato para a catalase (CAT; 1:2000; Sigma fast, EUA), os anticorpos policlonais de coelho para superóxido dismutase (SOD-2; 1:500; Sigma rápidos (USA) e anticorpos policlonais de coelho para AT1 e AT2 (1:500; Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA). Ao final do período de 4 horas as membranas foram lavadas em tampão TBS-tween 0,1%, sob agitação leve à temperatura ambiente e sob agitação leve foi incubado o anticorpo secundário

agitação leve em temperatura ambiente (IgG, anti-mouse conjugado para fosfatase alcalina - 1:3000, Abcam Inc. e IgG, anti-Rabbit conjugado para fosfatase alcalina – 1:7000, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) por 1:30 hora, à temperatura ambiente passando -se a pós a lavagem com tampão TBS-tween 0,1%, e posteriormente com tampão TBS.

A detecção da ligação proteína-anticorpo foi realizada fazendo uso do Kit comercial NBT/BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate nitro blue tetrazolium (NBT) /5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP) – Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. As membranas tiveram suas imagens digitalizadas e tratadas utilizando o programa Image J (*domínio público*). Em cada ensaio experimental fez-se a normalização em relação ao controle (β -actina).

3.5 Histologia do rim

Foram separados 16 rins (direito) dos camundongos analisadas 4 para cada grupo. Os rins dos camundongos de todos os grupos foram previamente colocados em solução de paraformaldeído 4% -PBS pH 7,4 para fixação durando 48 horas seguindo os protocolos do laboratório multiusuário (LABIOM) da UFES (DIXIT et al., 2014). Ao termino da fixação, amostras de rim foram submetidas a um processo de desidratação graduada em que foi utilizado álcoois com ascendentes graus alcoólicos até o álcool absoluto, os tecidos foram embebidos em parafina à 60 °C e posterior emblocamento na parafina. As amostras foram guardadas em um freezer à -20°C até o momento da secção das fatias. Para a secção foi utilizado micrótomo manual (Leica RM2125 RTS).

Utilizou-se 1 lâmina de histologia para cada animal totalizando 16 lâminas colocando 3 fatias seccionadas de 5 μ c formando um n de 4. As lâminas foram coradas em hematoxilina-eosina para visualização das regiões renais (TRUJILLO et al., 2016). As leituras das lâminas foram feitas em fotomicroscópio (Leica DM2500) do laboratório Multiusuário (LHMI) da UFES.

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram apresentados com media \pm erro padrão da média. A análise foi feita por teste de normalidade ANOVA de 1 via, seguido pelo pós-teste de Fisher para avaliação das significâncias. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando GraphPadPrism (v. 7.0, GraphPad Software, Inc). O nível de significância foi $p < 0.05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Peso corporal e peso de fígado, rim e coração

Conforme pode ser visto na tabela 1 não houve diferença no peso corporal (PC) entre os grupos. Contudo foi encontrada alteração nos índices hipertróficos de coração fígado e pulmão para o grupo MPTP em relação ao grupo CON. Esse aumento de peso no grupo MPTP pode ser sugerido devido a uma possível inflamação gerada pela ativação da toxina MPTP no fígado. Segundo Uehara o MPTP pode ser ativado no citocromo p450 pela ação da enzima CYP 2D6. Uehara também cita a possibilidade da presença dessa enzima em outros órgãos o que pode justificar os índices hipertróficos alterados encontrados no coração e rim pertencentes ao grupo MPTP além do fígado (UEHARA et al., 2015). Apesar de haver poucos trabalhos que exploram o efeito tóxico fora do sistema nervoso, é conhecido que o estresse oxidativo é um fator importante na hipertrofia de órgãos (MAULIK; KUMAR, 2012; VIDELA, 2009).

A produção excessiva de ERO acarreta uma desordem excessiva ao órgão e a resposta do corpo através da inflamação pode aumentar a lesão já causada pelas EROs. Causando aumento desses órgãos não só por uma retenção maior de líquido, mas também de hipertrofia e alterações celulares. Oxidação dos lipídios das membranas plasmáticas das células que modificam suas funções normais podendo prejudicar sua fluidez, alterar a ativação de enzimas podendo acarretar alterações celulares levando a hipertrofia dos tecidos e consequentemente do órgão, altera também a permeabilidade aos íons podendo agravar ainda mais o dano a esses órgãos (OZCELIK et al., 2003). O MPTP tem

seu efeito de agente gerador de EROs, como a principal causa de dano causado por essa toxina, apesar do pouco estudo conhece-se sim um efeito do MPTP sobre o fígado e rim com alta produção de radicais livres lesionando esses órgãos. Esses radicais são produzidos pela interferência dessa toxina na respiração mitocondrial (BLOEM et al., 1990; UEHARA et al., 2015) gerando hepatotoxicidade também toxicidade no rim e coração podendo acarretar um aumento do peso úmido dos órgãos (DI MONTE et al., 2000; UEHARA et al., 2015).

No grupo MPTP/AR para coração, fígado e pulmão não foi encontrado alteração em relação grupo CON demonstrando assim um efeito protetor sobre esses órgãos em relação a alterações que podem levar a aumento de peso do órgão, podendo esse efeito ser devido a um bloqueio da peroxidação de lipídios da membrana plasmática (HASANEIN; SEIFI, 2018). Estudos tem demonstrado que o alecrim, rico em ácido rosmarínico, tem efeito protetor sobre o fígado, agindo como antioxidante, anti-inflamatório e anti-apoptótico. O AR agindo como antioxidante sobre as membranas e bloqueando possíveis inflamações no fígado, coração e rim justifica o resultado encontrado no grupo MPTP/AR desses órgãos.

	CON	AR	MPTP	MPTP-AR
Peso corporal (g)	28.8± 1.2	27.1± 0.3	25.5 ± 0.7	26.3 ± 0.7
Peso rim esquerdo (g)	0.161 ± 0.009	0.158 ± 0.007	0.170 ± 0.008	0.152 ± 0.009
Peso fígado (g)	1.285 ± 0.046	1.322 ± 0.033	1.413 ± 0.046	1.315 ± 0.006
Peso coração (g)	0.147 ± 0.009	0.148 ± 0.007	0.140 ± 0.008	0.144 ± 0.010

Os valores foram expressos como média ± EPM. **p < 0.01 vs CON. O número de animais foi N=10 para todos os grupos (ANOVA-Fisher).

Tabela 1 peso dos órgãos dos grupos não demonstraram alteração em relação ao grupo CON

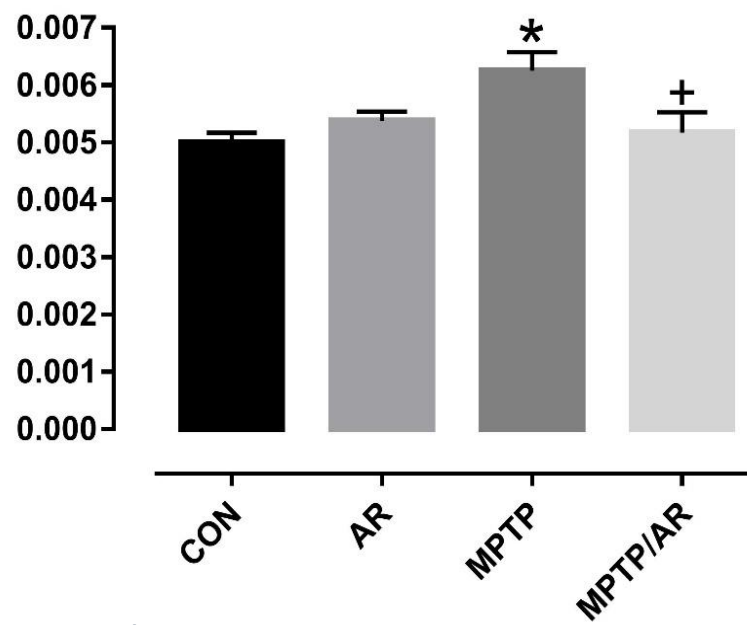


Figura 4 Índice hipertrófico do rim aumentado para o grupo MPTP e normalização dos valores no grupo MPTP/AR

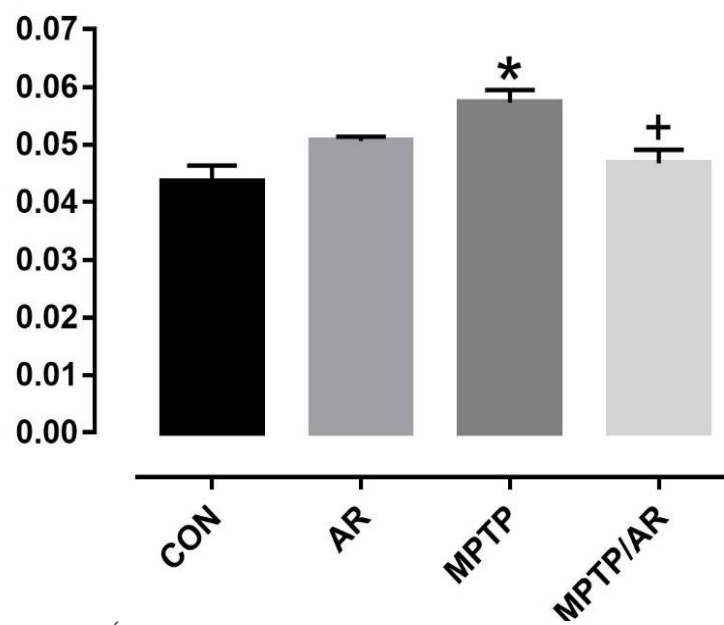


Figura 5 Índice hipertrófico do fígado aumentado para o grupo MPTP e normalização dos valores no grupo MPTP/AR

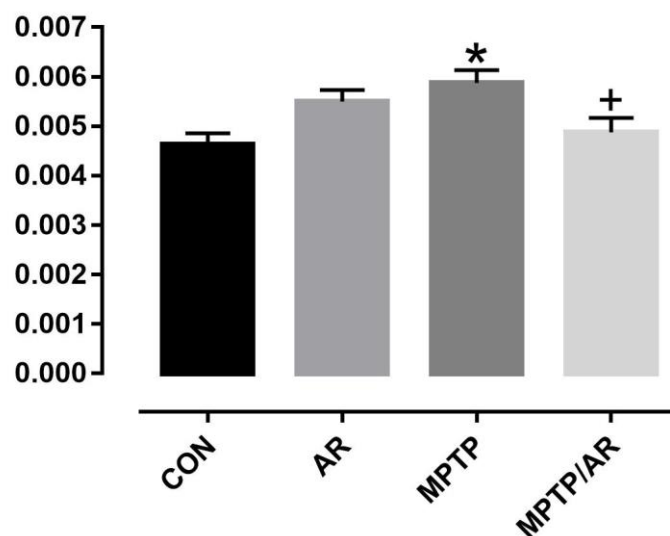


Figura 6 Índice hipertrófico do coração aumentado para o grupo MPTP e normalização dos valores no grupo MPTP/AR

5.2 Histologia do rim

As amostras foram analisadas qualitativamente e foi encontrado prejuízos histomorfométricos no grupo MPTP e MPTP/AR. Foram encontradas lesões como desorganização da borda em escova nas células dos túbulos proximais, vacuolização no epitélio tubular, e também exemplo de células apoptóticas e possíveis células inflamatórias (mastócitos).

Fica evidente nas fotos da figura 4 um aparente maior número de lesões nas amostras de camundongos tratados com a toxina MPTP 4-E e 4-F, contudo aparecem também lesões no grupo MPTP/AR apesar de ser em menor número 4-G e 4-H. A Figura 4-A e 4-B representam o grupo CON e a Figura 4-C e 4-D representam o grupo AR. Observamos um número irrisório de lesões renais nos dois grupos, podendo assim considerar os tecidos com características histomorfométricas normais. Os achados mostram que o MPTP tem um efeito lesionador potente sobre o tecido renal, possivelmente por estresse oxidativo.

Apesar do rim estar exposto a diversos exemplares de substâncias e altas concentrações de drogas (HOSOHATA, 2016), as lesões encontradas nesse órgão, provocadas por esse recorrente contato com essas toxinas se mantém sempre em um padrão limitado. O tipo de lesão encontrada depende que parte

do tecido renal que é afetado primeiro, a maioria das drogas afetam primeiro túbulos e interstício (MARKOWITZ; PERAZELLA, 2005). Mas esse padrão não foi encontrado nas lesões causadas pelo MPTP, houve uma distribuição por igual das lesões no grupo MPTP (E, F, figura 4) sendo encontrada perda da borda escova, células apoptóticas, vacuolização tubular e vários exemplos de células inflamatórias. Essas lesões tem sido demonstradas em estudos que avaliaram rins expostos a substancias toxicas promovendo lesão renal aguda (FUJIGAKI et al., 2017).

Lesões no túbulo proximal como perda da borda escova ligadas a aumento de EROs podem ser devido a alteração na função das mitocôndrias e danos na membrana plasmática (HOSOHATA, 2016). Também a presença de células inflamatórias é característica de uma lesão recorrente de acúmulo de EROs na região do túbulo proximal renal (DENNIS; WITTING, 2017), foi encontrado presença de mastócitos nas imagens 4-E e 4-F caracterizando um possível processo inflamatório se instalando.

Estudos tem demonstrado que a presença excessiva de EROs tem alterado a permeabilidade celular. A presença de vacuolização e achados de células apoptótica é ligado a uma maior produção de EROs (HAO et al., 2013). Apesar do efeito comprovado do MPTP como grande gerador de EROs não há muitos estudos explorando esse efeito nos rins, contudo lesões com características de ser provocadas por EROs é visível nas imagens dos grupos que entraram em contato com a toxina imagens 4-E e 4-F e 4-G e 4-H.

Apesar de ser notado que as imagens 4-G e 4-H, pertencentes ao grupo MPTP/AR, ainda mostrarem as mesmas lesões vistas no grupo que foi exposto somente ao MPTP é notado que essas lesões apareceram em menor número mostrando assim efeito protetor sobre as células por parte do AR como foi anteriormente citado pelo seu efeito como antioxidante e anti-inflamatório.

O AR tem melhorado o efeito da SOD e catalase de rins diabéticos de ratos induzidos por estreptozotocina o que gera esperada queda nas taxas de EROs produzidos, como também uma queda na oxidação dos lipídios e proteínas nesses animais (MUSHTAQ et al., 2015).

A presença dos grupos catecóis na molécula tem demonstrado eficiência contra diversos danos provocados por estresse oxidativo, inclusive lesões no DNA. Também o MPP⁺, íon ativo do MPTP, é um ótimo substrato para as estruturas catecóis do AR (EXARCHOU et al., 2002; KOPIN, 1987; SILVA; GOMES; COUTINHO, 2008).

O AR pode quebrar o ciclo de aumento de EROs e levar ao aumento de enzimas antioxidantes endógenas como SOD e CATALASE em ratos com toxicidade causada por gentamicina (HOSOHATA 2016), contudo a dose de AR é o dobro da utilizada em nosso trabalho o que somado com o uso de gentamicina ao invés de MPTP pode justificar a ausência de alterações nessas proteínas nos grupos analisados. Ainda pode-se acrescentar que o possível efeito tóxico da gentamicina é similar ao do MPTP bloqueando parte da cadeia transportadora de elétrons. Supondo assim, que como os valores de MPTP e AR utilizados nesse trabalho foram escolhidos por ter comprovado efeito em áreas específicas do sistema nervoso central para poder simular Parkinson é possível que se houvesse um aumento da dose de MPTP e AR teríamos encontrado os mesmos resultados encontrados no trabalho citado anteriormente como um inicial queda nas enzimas antioxidantes e normalização do níveis aos grupos tratados com AR (BAYOMY et al., 2017).

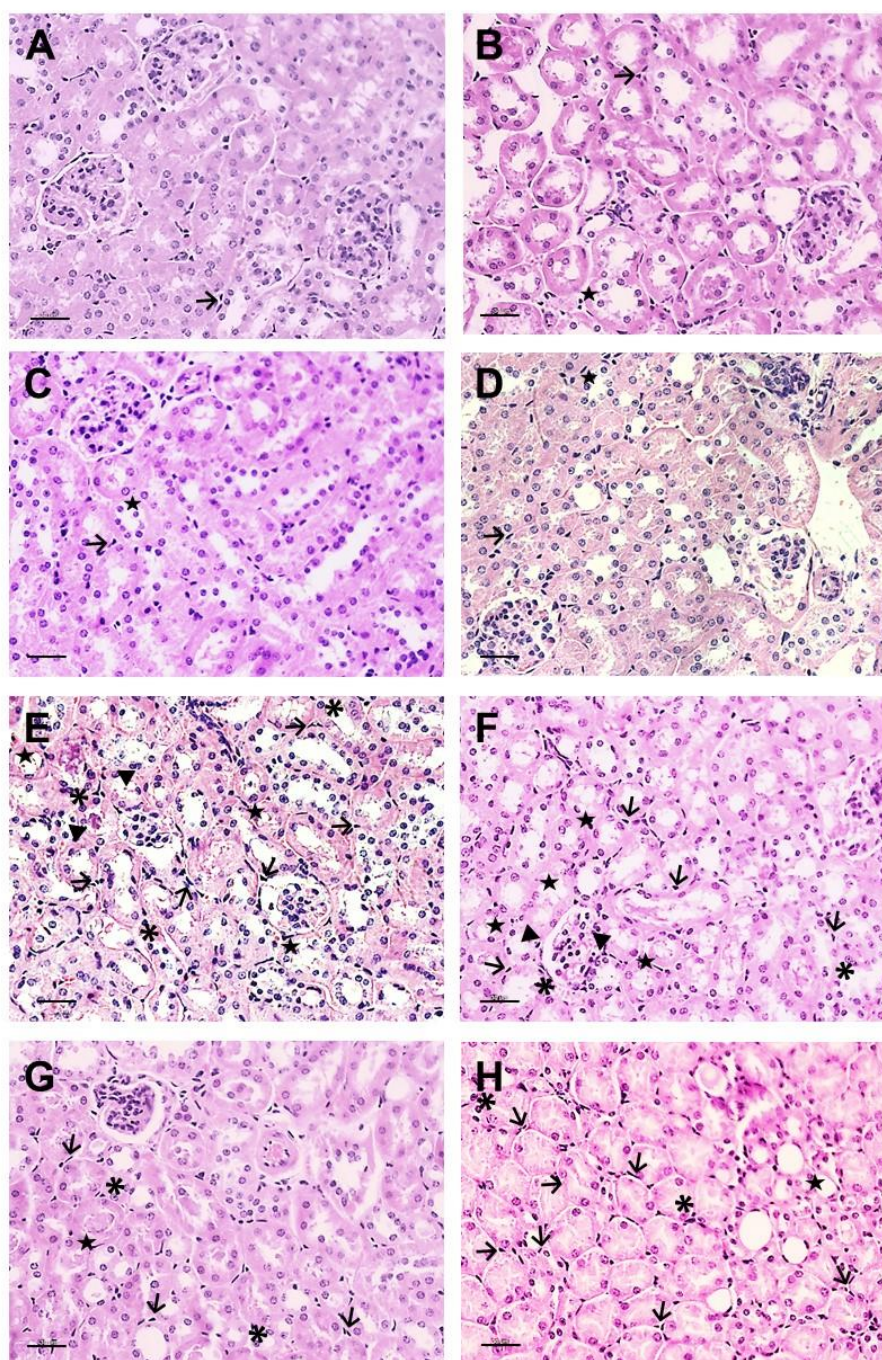


Figura 7 Imagens representativas do córtex renal de camundongos dos grupos CON, ÁCIDO ROSMARÍNICO (AR), MPTP e MPTP-AR. As imagens foram coradas com H&E. A) região glomerular renal do grupo CON, (C) AR, (E) MPTP e (G) MPTP-AR. Região túbulo-intersticial dos animais B) CON, (D) AR, (F) MPTP e (H) MPTP-AR. O MPTP causou prejuízos histomorfométricos nos camundongos tratados, sendo verificada a presença de desorganização na borda em escova das células do túbulo proximal (cabeça de seta), vacuolização tubular (estrela), células apoptóticas (asterísco) e possíveis células inflamatórias (setas). As imagens estão com a barra de escala com 30 μ m

5.3 Expressões proteicas do receptor AT1 e AT2

Realizou Western blot no tronco encefálico para avaliarmos a expressão de 3 proteínas pertencentes ao sistema renina (AT1, AT2 e ECA1) e 2 enzimas antioxidantes (SOD e catalase).

Não foi possível fazer a detecção da expressão do receptor AT1 em nenhum dos grupos analisados pela técnica de Western blot. Este resultado pode ser explicado pela baixa expressão destes receptores no tronco (DAMPNEY 2007), ou pela ineficácia do método. Este resultado é uma limitação do estudo, onde posteriormente deverá ser analisado com uso de outro anticorpo para detecção do AT1.

Observamos uma redução significativa da expressão do receptor AT2 no grupo MPTP quando comparado ao grupo CON (Figura 5). Essa diferença não foi observada no grupo MPTP/AR, mostrando que o tratamento com AR foi capaz manter a expressão do receptor AT2 em relação ao grupo controle.

É conhecido que o SRA está presente em todo sistema nervoso central e que receptores como o AT1 e o AT2 participam de diversas funções, além das clássicas em relação a pressão arterial e de fluidos e eletrólitos (GUIMOND; GALLO-PAYET, 2012). Apesar de alguns trabalhos relatarem que o SRA tem sua expressão e função mais importantes fora de áreas do cérebro (GALLO-PAYET et al., 2012; VERDONK; DANSER; VAN ESCH, 2012) o sistema está presente em regiões do tronco encefálico principalmente no bulbo, participando do centro cardiorrespiratório e outras áreas. Tem também as funções autônoma, de memória e coordenação (LAZARONI et al., 2012; LENKEI et al., 1996).

É bem conhecido que a Ang II ativa NADPH induzindo assim a produção de radicais superóxido podendo gerar estresse oxidativo, e que o tronco encefálico juntamente com outras áreas do cérebro participam das disfunções neuro cardiovasculares da hipertensão (BRAGA; COLOMBARI; JOVITA, 2011). As EROs tem importante papel em alterações no cérebro, principalmente de proteínas, que são substratos da Ang II como os receptores AT1 e AT2 que podem levar a hipertensão neurogênica (BURMEISTER et al., 2011; PETERSON et al., 2009).

A relação da expressão do receptor AT1 com EROs sobre o centro cardiovascular do RVLM é bem documentado e a utilização de antioxidantes para o bloqueio dessas espécies reativas do oxigênio tem efeito regulador sobre as alterações causadas, como também a expressão do receptor AT2 agindo como contrarregulação através das cascatas das bradicininas e NO entre outras (NISHI et al., 2013). Mas neste estudo não foi possível a detecção da expressão de AT1.

O que foi citado corrobora o resultado encontrado no Western blotting que mostrou uma evidente queda dos receptores AT2 no grupo MPTP em relação ao grupo CON possivelmente devido à alta carga de EROs presentes na região analisada. Notou-se também o efeito antioxidante protetor por parte AR quando no resultado do grupo MPTP/AR há um aumento significativo da expressão de AT2 em relação ao grupo MPTP. O bloqueio das EROs por parte de AR desencadeou os sistemas endógenos de regulação das alterações ocorridas com a possível vasodilatação promovida pelo AT2.

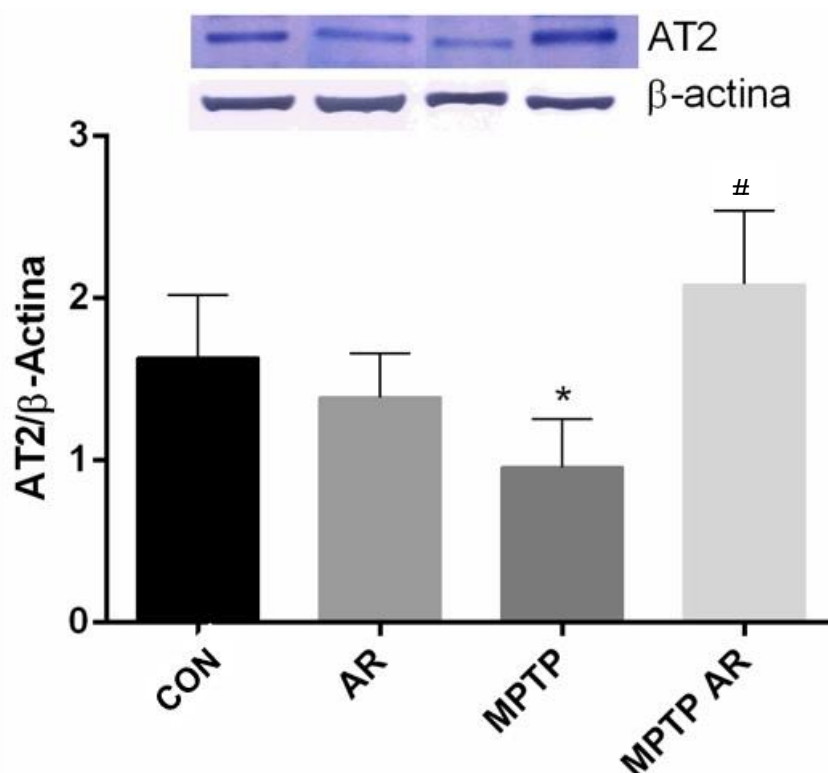


Figura 8. Expressão proteica do receptor AT2 no tronco encefálico. ($n = 5$ para todos os grupos). $*p < 0.05$. vs. Controle, # $p < 0.05$. vs. MPTP, (One-way) ANOVA - Fisher

5.4 Expressão proteica de ECA1, SOD e Catalase

Como observado na figura 6 não houveram diferenças significativas entre os grupos sobre a expressão da enzima ECA1 no tronco encefálico.

Também não foram observadas diferenças na isoforma mitocondrial da enzima superóxido dismutase (SOD) (Figura 7).

Fazendo análise da enzima catalase que decompõe o peróxido de hidrogênio em H_2O e O_2 não foi notado diferença significativa dos grupos MPTP, MPTP/AR e AR em relação ao grupo controle.

Com a presença do MPTP acredita-se haver um aumento da presença de EROs e as enzimas antioxidantes como SOD e catalase tem um papel importante promovendo a homeostase dos sistemas pró e anti-oxidante (VALENTI et al., 2013). Estudos explorando o efeito do MPTP demonstram que sua forma ativa (MPP^+) age bloqueando a cadeia transportadora de elétrons, levando a um aumento da produção de EROs (LAN; JIANG, 1997). Apesar de alguns estudos mostrarem uma queda na concentração de SOD e catalase outros, contudo vem demonstrando aumento dessas proteínas (ANANDHAN et al., 2010; JACOB; NALINI; CHIDAMBARANATHAN, 2013).

Mesmo que o efeito do MPTP sobre a cadeia transportadora de elétrons tenha sido bem discutido, ainda não se pode afirmar que essa realmente é a forma pela qual essa toxina promove a morte celular, nem mesmo de neurônios ligados a doença de Parkinson (LANGSTON, 2017).

Em nosso estudo não foi possível detectar aumento da SOD e catalase, mesmo tendo visto mudança na expressão do receptor AT2, não é possível afirmar que as alterações encontradas foram devido ao aumento de EROs agindo sobre o SRA local da região do tronco, o que se acredita podendo ser devido à falta de um conhecimento melhor do funcionamento do MPTP sobre os tecidos expostos a ele. Resultados de outros estudos corroboraram o resultado encontrado em nosso estudo para a ECA1, não havendo mudança significativa para nenhum dos grupos (GUIMOND; GALLO-PAYET, 2012).

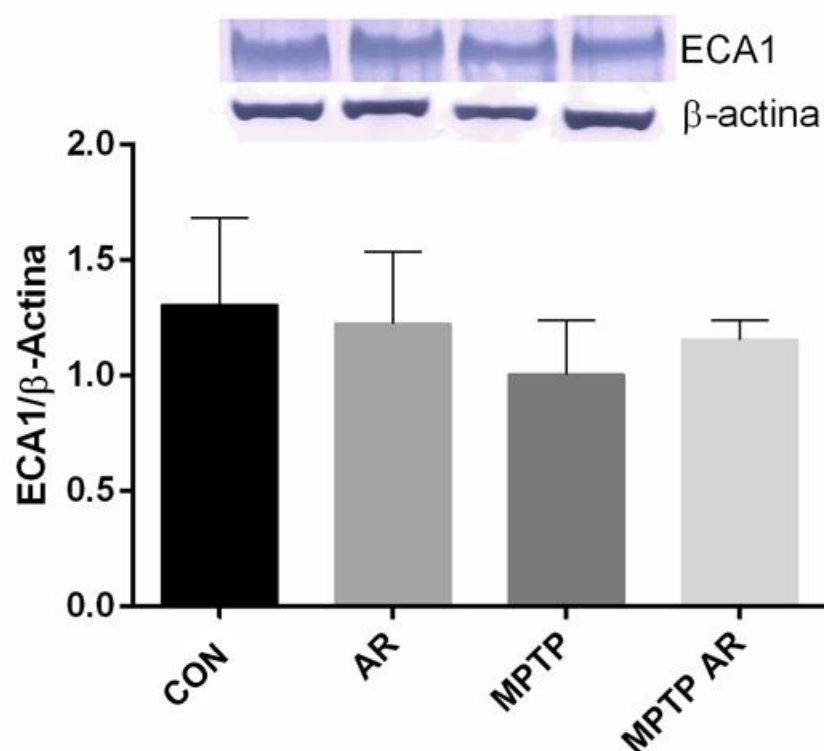


Figura 9 Expressão da enzima ECA 1 no tronco encefálico, comparados por ANOVA - Fisher. ($n = 5$ para todos os grupos)..

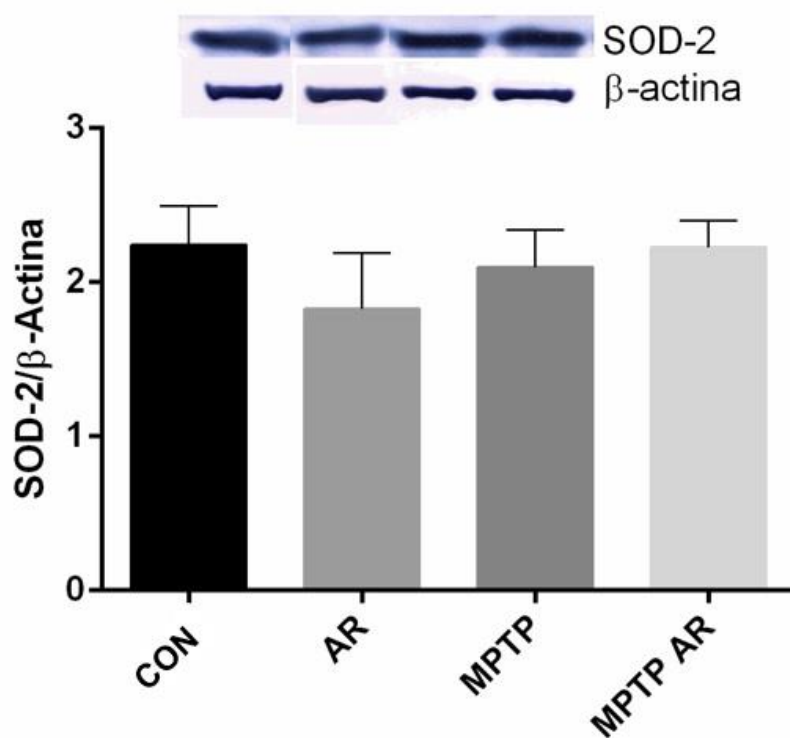


Figura 10 Expressão de superóxido dismutase (SOD) no tronco encefálico, comparados por ANOVA- Fisher. ($n = 5$ para todos os grupos).

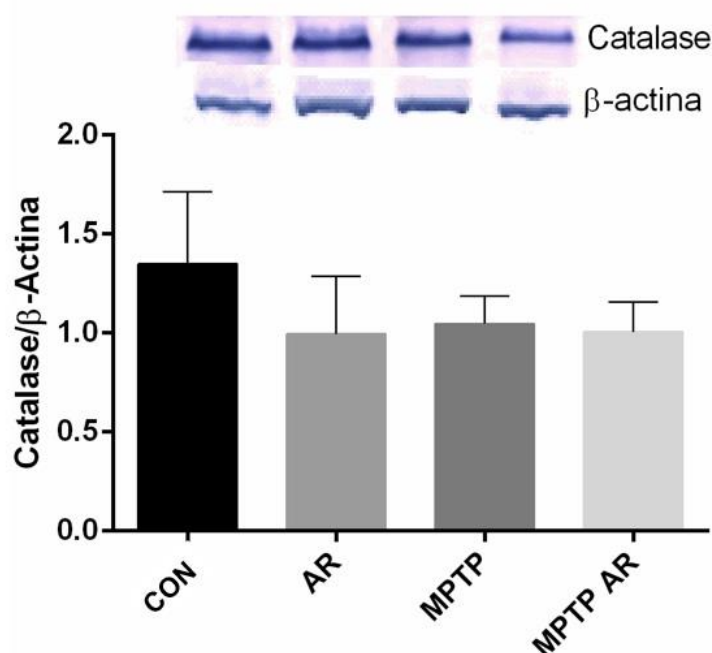


Figura 11 Expressão de catalase no tronco encefálico, comparados por ANOVA- Fisher. ($n = 5$ para todos os grupos).

Os animais utilizados neste estudo foram submetidos ao teste comportamental que não mostrou diferença entre os grupos para os testes de rotarod e pole test, assim como mostrado em outros estudos (HILARIO et al., 2016; ZHANG et al., 2017). Nos parâmetros motores, foi observado uma hiperlocomoção nos animais tratados com MPTP, sendo este efeito prevenido pelo tratamento oral com o AR, esses dados foram apresentados por Silva, 2018. Esse resultado demonstra uma atividade neuroprotetiva por parte do AR para a toxicidade do MPTP sobre neurônios

Os resultados de melhora das performances encontrados para o grupo MPTP/AR não são totalmente entendidos. E os possíveis mecanismos da hiperlocomoção encontradas no grupo MPTP ainda não estão totalmente elucidados, várias evidências sugerem que a denervação de neurônios dopaminérgico podem resultar em mecanismos compensatórios (BEZARD; GROSS, 1998; BLESÁ et al., 2017). Contudo esse fenômeno pode ser dopaminérgico ou não e podem estar relacionados as mudanças adaptativas nos núcleos da base e suas conexões (SCHAPIRA; CHAUDHURI; JENNER, 2017).

Desta forma o AR atua nestas áreas do SNC, mas é também capaz de atuar em outras áreas podendo ser utilizado em modelos experimentais que envolvam EROs, como no nosso modelo de Parkinson.

6 CONCLUSÃO

podemos concluir no presente estudo que o AR influencia o SRA no tronco encefálico e apesar do tratamento com AR não alterar a expressão de ECA1. O ácido rosmarínico pode ter um efeito protetor sobre a expressão de receptores AT2 alterados pela exposição a toxina MPTP.

O ácido rosmarínico pode ter papel importante como antioxidante protetor sobre os órgãos afetados pelo MPTP podendo ser mais estudado para ser uma possível alternativa natural para tratamento de doenças causadas alterações no sistema renina angiotensina aldosterona.

7 REFERÊNCIAS

ABDALLA, S. et al. The Angiotensin II AT₂ Receptor Is an AT₁ Receptor Antagonist. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 43, p. 39721–39726, 26 out. 2001.

ACHAMLALE, S.; REZZONICO, B.; GRIGNON-DUBOIS, M. Rosmarinic acid from beach waste: Isolation and HPLC quantification in *Zostera detritus* from Arcachon lagoon. **Food Chemistry**, v. 113, n. 4, p. 878–883, abr. 2009.

AL-DHABI, N. A. et al. Recent studies on rosmarinic acid and its biological and pharmacological activities. **EXCLI journal**, v. 13, p. 1192–5, 2014.

ALKAM, T. et al. A natural scavenger of peroxynitrites, rosmarinic acid, protects against impairment of memory induced by A β 25–35. **Behavioural Brain Research**, v. 180, n. 2, p. 139–145, 18 jun. 2007.

ALLEN, A. M. et al. Angiotensin receptors in the nervous system. **Brain research bulletin**, v. 47, n. 1, p. 17–28, 1 set. 1998.

ALLEN, A. M. et al. Expression of Constitutively Active Angiotensin Receptors in the Rostral Ventrolateral Medulla Increases Blood Pressure. **Hypertension**, v. 47, n. 6, p. 1054–1061, 1 jun. 2006.

AMOAHA, S. et al. Rosmarinic Acid – Pharmaceutical and Clinical Aspects. **Planta Medica**, v. 82, n. 5, p. 388–406, 4 fev. 2016a.

AMOAHA, S. et al. Rosmarinic Acid – Pharmaceutical and Clinical Aspects. **Planta Medica**, v. 82, n. 5, p. 388–406, 4 fev. 2016b.

ANANDHAN, A. et al. Resveratrol attenuates oxidative stress and improves behaviour in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) challenged mice. **Annals of neurosciences**, v. 17, n. 3, p. 113–9, jul. 2010.

ANAS, A. A. et al. Recent insights into the pathogenesis of bacterial sepsis. **The Netherlands journal of medicine**, v. 68, n. 4, p. 147–52, abr. 2010.

APRIOKU, J. S. Pharmacology of free radicals and the impact of reactive oxygen species on the testis. **Journal of reproduction & infertility**, v. 14, n. 4, p. 158–

72, out. 2013.

AQUINO, R. et al. A flavanone glycoside from *Hamelia patens*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 7, p. 2359–2360, jan. 1990.

ARDALAN, M. R.; RAFIEIAN-KOPAEI, M. Antioxidant supplementation in hypertension. **Journal of renal injury prevention**, v. 3, n. 2, p. 39–40, 2014.

AVERILL, D. B.; DIZ, D. I. Angiotensin peptides and baroreflex control of sympathetic outflow: pathways and mechanisms of the medulla oblongata. **Brain research bulletin**, v. 51, n. 2, p. 119–28, 15 jan. 2000.

AYRANCI, E.; ERKAN, N. Radical Scavenging Capacity of Methanolic *Phillyrea latifolia* L. Extract: Anthocyanin and Phenolic Acids Composition of Fruits. **Molecules**, v. 18, n. 2, p. 1798–1810, 30 jan. 2013.

BAKOTA, E. L. et al. Antioxidant Activity and Sensory Evaluation of a Rosmarinic Acid-Enriched Extract of *Salvia officinalis*. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 4, p. C711–C717, abr. 2015.

BARADARAN, A.; NASRI, H.; RAFIEIAN-KOPAEI, M. Oxidative stress and hypertension: Possibility of hypertension therapy with antioxidants. **Journal of research in medical sciences : the official journal of Isfahan University of Medical Sciences**, v. 19, n. 4, p. 358–67, abr. 2014.

BARANYI, M. et al. Novel (Hetero)arylalkenyl propargylamine compounds are protective in toxin-induced models of Parkinson's disease. **Molecular neurodegeneration**, v. 11, p. 6, 13 jan. 2016.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629–643, ago. 2010.

BARKOVICH, A. J.; MILLEN, K. J.; DOBYNS, W. B. A developmental and genetic classification for midbrain-hindbrain malformations. **Brain : a journal of neurology**, v. 132, n. Pt 12, p. 3199–230, dez. 2009.

BAYOMY, N. A. et al. Effect of Lycopene and Rosmarinic Acid on Gentamicin Induced Renal Cortical Oxidative Stress, Apoptosis, and Autophagy in Adult Male Albino Rat. **The Anatomical Record**, v. 300, n. 6, p. 1137–1149, 1 jun. 2017.

BEZARD, E.; GROSS, C. E. Compensatory mechanisms in experimental and human parkinsonism: towards a dynamic approach. **Progress in neurobiology**, v. 55, n. 2, p. 93–116, jun. 1998.

BIRBEN, E. et al. Oxidative stress and antioxidant defense. **The World Allergy Organization journal**, v. 5, n. 1, p. 9–19, jan. 2012.

BLESA, J. et al. Compensatory mechanisms in Parkinson's disease: Circuits adaptations and role in disease modification. **Experimental Neurology**, v. 298, n. Pt B, p. 148–161, dez. 2017.

BLOEM, B. R. et al. The MPTP model: versatile contributions to the treatment of idiopathic Parkinson's disease. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 97, n. 2–3, p. 273–293, 1 jul. 1990.

BOVÉ, J. et al. **Toxin-Induced Models of Parkinson's Disease** **NeuroRx**, jul. 2005.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 7 maio 1976.

BRAGA, V. A.; COLOMBARI, E.; JOVITA, M. G. Angiotensin II-derived reactive oxygen species underpinning the processing of the cardiovascular reflexes in the medulla oblongata. **Neuroscience Bulletin**, v. 27, n. 4, p. 269–274, 5 ago. 2011.

BURMEISTER, M. A. et al. In Vivo Bioluminescence Imaging Reveals Redox-Regulated Activator Protein-1 Activation in Paraventricular Nucleus of Mice With Renovascular Hypertension. **Hypertension**, v. 57, n. 2, p. 289–297, 1 fev. 2011.

CASTELLANI, R. et al. Glycooxidation and oxidative stress in Parkinson disease and diffuse Lewy body disease. **Brain Research**, v. 737, n. 1–2, p. 195–200, 21 out. 1996.

CHUGH, G.; LOKHANDWALA, M. F.; ASGHAR, M. Oxidative stress alters renal D1 and AT1 receptor functions and increases blood pressure in old rats. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 300, n. 1, p. F133–F138, jan. 2011.

CORDEIRO, R. M. Reactive oxygen species at phospholipid bilayers:

Distribution, mobility and permeation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1838, n. 1, p. 438–444, 1 jan. 2014.

COTRAN, R. S. **Robbins patologia estrutural e funcional**. [s.l.] Guanabara Koogan, 2000.

CRAVO, S. L. et al. Role of the medulla oblongata in normal and high arterial blood pressure regulation: the contribution of Escola Paulista de Medicina - UNIFESP. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81, n. 3, p. 589–603, set. 2009.

DAMPNEY, R. A. L. et al. Cardiovascular effects of angiotensin II in the rostral ventrolateral medulla: the push-pull hypothesis. **Current hypertension reports**, v. 9, n. 3, p. 222–7, jun. 2007.

DE QUEIROZ, T. M.; MONTEIRO, M. M. O.; BRAGA, V. A. Angiotensin-II-derived reactive oxygen species on baroreflex sensitivity during hypertension: new perspectives. **Frontiers in physiology**, v. 4, p. 105, 2013.

DENNIS, J. M.; WITTING, P. K. Protective Role for Antioxidants in Acute Kidney Disease. **Nutrients**, v. 9, n. 7, 7 jul. 2017.

DI MONTE, D. et al. Quantitative analysis of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine metabolism in isolated rat hepatocytes. **Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals**, v. 16, n. 2, p. 250–5, 1 maio 2000.

DIXIT, S. G. et al. To study the effect of monosodium glutamate on histomorphometry of cortex of kidney in adult albino rats. **Renal Failure**, v. 36, n. 2, p. 266–270, 4 mar. 2014.

DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **Journal of the American Pharmaceutical Association. American Pharmaceutical Association**, v. 46, n. 3, p. 208–9, mar. 1957.

ELBAZ, A.; MOISAN, F. Update in the epidemiology of Parkinson's disease. **Current Opinion in Neurology**, v. 24, n. 4, p. 454–460, ago. 2008.

ELLIS, B. E.; TOWERS, G. H. Biogenesis of rosmarinic acid in *Mentha*. **The**

Biochemical journal, v. 118, n. 2, p. 291–7, jun. 1970.

ERNST, O.; ZOR, T. Linearization of the bradford protein assay. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 38, 12 abr. 2010.

EXARCHOU, V. et al. Antioxidant activities and phenolic composition of extracts from Greek oregano, Greek sage, and summer savory. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, n. 19, p. 5294–9, 11 set. 2002.

FADEL, O.; EL KIRAT, K.; MORANDAT, S. The natural antioxidant rosmarinic acid spontaneously penetrates membranes to inhibit lipid peroxidation in situ. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1808, n. 12, p. 2973–2980, 1 dez. 2011.

FAHN, S. The medical treatment of Parkinson disease from James Parkinson to George Cotzias. **Movement Disorders**, v. 30, n. 1, p. 4–18, jan. 2015.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61–68, mar. 1997.

FERREIRA, L. G. et al. Effect of rosmarinic acid on the arterial blood pressure in normotensive and hypertensive rats: Role of ACE. **Phytomedicine**, v. 38, p. 158–165, 1 jan. 2018.

FUJIGAKI, Y. et al. Unique proximal tubular cell injury and the development of acute kidney injury in adult patients with minimal change nephrotic syndrome. **BMC nephrology**, v. 18, n. 1, p. 339, 28 nov. 2017.

GALLO-PAYET, N. et al. AT2 Receptor Agonists: Exploiting the Beneficial Arm of Ang II Signaling. **Current Hypertension Reviews**, v. 8, n. 1, p. 47–59, 1 abr. 2012.

GIL, E. DE S.; ENACHE, T. A.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Redox behaviour of verbascoside and rosmarinic acid. **Combinatorial chemistry & high throughput screening**, v. 16, n. 2, p. 92–7, fev. 2013.

GOETZ, C. G. The History of Parkinson's Disease: Early Clinical Descriptions and Neurological Therapies. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 1, n. 1, 2011.

GRIENDLING, K. K.; MURPHY, T. J.; ALEXANDER, R. W. Molecular biology of the renin-angiotensin system. **Circulation**, v. 87, n. 6, p. 1816–28, jun. 1993.

GUIMOND, M.-O.; GALLO-PAYET, N. How does angiotensin AT2 receptor activation help neuronal differentiation and improve neuronal pathological situations? **Frontiers in Endocrinology**, v. 3, p. 164, 19 dez. 2012.

HAO, S. et al. Primary medulla oblongata germinomas: two case reports and review of the literature. **World journal of surgical oncology**, v. 11, p. 274, 15 out. 2013.

HASANEIN, P.; SEIFI, R. Beneficial effects of rosmarinic acid against alcohol-induced hepatotoxicity in rats. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 96, n. 1, p. 32–37, jan. 2018.

HILARIO, W. F. et al. Cholinergic and Dopaminergic Alterations in Nigrostriatal Neurons Are Involved in Environmental Enrichment Motor Protection in a Mouse Model of Parkinson's Disease. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 60, n. 4, p. 453–464, 22 dez. 2016.

HOSOHATA, K. Role of Oxidative Stress in Drug-Induced Kidney Injury. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 11, 1 nov. 2016.

HUANG, H.-L. et al. Antioxidative principals of Jussiaea repens: an edible medicinal plant. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 42, n. 10, p. 1219–1227, out. 2007.

INNAMORATO, N. G. et al. **Different Susceptibility to the Parkinson's Toxin MPTP in Mice Lacking the Redox Master Regulator Nrf2 or Its Target Gene Heme Oxygenase-1** (D. Finkelstein, Ed.) **PLoS ONE** San Francisco, USA, 2010.

IWAI, M.; HORIUCHI, M. Devil and angel in the renin–angiotensin system: ACE–angiotensin II–AT1 receptor axis vs. ACE2–angiotensin-(1–7)–Mas receptor axis. **Hypertension Research**, v. 32, n. 7, p. 533–536, 22 jul. 2009.

JACOB, R.; NALINI, G.; CHIDAMBARANATHAN, N. Neuroprotective effect of *Rhodiola rosea* Linn against MPTP induced cognitive impairment and oxidative stress. **Annals of neurosciences**, v. 20, n. 2, p. 47–51, abr. 2013.

JIANG, B. et al. Salvianolic Acid A, a Novel Matrix Metalloproteinase-9 Inhibitor,

Prevents Cardiac Remodeling in Spontaneously Hypertensive Rats. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. e59621, 22 mar. 2013.

JOTZ G.; MARRONE A. C.; STEFANI M.; BIZZI; J. W.; AQUINI M.
Neuroanatomia Clínica e Funcional - 1ª EDIÇÃO | Podcasts | Medicina | Elsevier.

KEHRER, J. P. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. **Toxicology**, v. 149, n. 1, p. 43–50, 14 ago. 2000.

KOPIN, I. J. MPTP: an industrial chemical and contaminant of illicit narcotics stimulates a new era in research on Parkinson's disease. **Environmental health perspectives**, v. 75, p. 45–51, nov. 1987.

LAN, J.; JIANG, D. H. Excessive iron accumulation in the brain: A possible potential risk of neurodegeneration in Parkinson's disease. **Journal of Neural Transmission**, v. 104, n. 6–7, p. 649–660, jun. 1997.

LANGSTON, J. W. The MPTP Story. **Journal of Parkinson's disease**, v. 7, n. s1, p. S11–S22, 2017.

LAZARONI, T. L. N. et al. Angiotensin-(1–7)/Mas axis integrity is required for the expression of object recognition memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 97, n. 1, p. 113–123, jan. 2012.

LEBOUVIER, T. et al. The second brain and Parkinson's disease. **European Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 5, p. 735–741, set. 2009.

LEES, A. J.; TOLOSA, E.; OLANOW, C. W. Four pioneers of L-dopa treatment: Arvid Carlsson, Oleh Hornykiewicz, George Cotzias, and Melvin Yahr. **Movement Disorders**, v. 30, n. 1, p. 19–36, jan. 2015.

LENKEI, Z. et al. Distribution of angiotensin II type-2 receptor (AT2) mRNA expression in the adult rat brain. **The Journal of comparative neurology**, v. 373, n. 3, p. 322–39, 23 set. 1996.

LIU, J.; HAKUCHO, A.; FUJIMIYA, T. Angiotensinase C mRNA and Protein Downregulations Are Involved in Ethanol-Deteriorated Left Ventricular Systolic Dysfunction in Spontaneously Hypertensive Rats. **BioMed research international**, v. 2015, p. 409350, 2015.

LOBO, V. et al. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy reviews**, v. 4, n. 8, p. 118–26, jul. 2010.

LOPEZ, B. et al. Role of Superoxide in Modulating the Renal Effects of Angiotensin II. **Hypertension**, v. 42, n. 6, p. 1150–1156, 1 dez. 2003.

LOU, K. et al. Rosmarinic acid stimulates liver regeneration through the mTOR pathway. **Phytomedicine**, v. 23, n. 13, p. 1574–1582, 1 dez. 2016.

LUO, H. et al. Oxidative stress causes imbalance of renal renin angiotensin system (RAS) components and hypertension in obese Zucker rats. **Journal of the American Heart Association**, v. 4, n. 2, 16 fev. 2015.

MACHADO, A. B. M.; HAERTEL, L. M. **Neuroanatomia funcional**. [s.l.] Atheneu, 2014.

MANRIQUE, C. et al. **The Renin Angiotensin Aldosterone System in Hypertension: Roles of Insulin Resistance and Oxidative Stress**The Medical clinics of North America, maio 2009.

MARKOWITZ, G. S.; PERAZELLA, M. A. Drug-induced renal failure: a focus on tubulointerstitial disease. **Clinica Chimica Acta**, v. 351, n. 1–2, p. 31–47, jan. 2005.

MASSANO, J.; BHATIA, K. P. Clinical approach to Parkinson's disease: features, diagnosis, and principles of management. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 2, n. 6, p. a008870, jun. 2012.

MATSUNO, M. et al. CYP98A6 from *Lithospermum erythrorhizon* encodes 4-coumaroyl-4'-hydroxyphenyllactic acid 3-hydroxylase involved in rosmarinic acid biosynthesis. **FEBS letters**, v. 514, n. 2–3, p. 219–24, 13 mar. 2002.

MEREDITH, G. E. **MPTP Mouse Models of Parkinson's Disease: An Update**, jan. 2011.

MORAES, L. S. et al. Medicinal plant *Combretum leprosum* mart ameliorates motor, biochemical and molecular alterations in a Parkinson's disease model induced by MPTP. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 185, p. 68–76, 5 jun. 2016.

MUSHTAQ, N. et al. Protective effect of rosmarinic acid against oxidative stress biomarkers in liver and kidney of streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 71, n. 4, p. 743–751, 9 dez. 2015.

NICOLAI, M. et al. Antioxidant activity and rosmarinic acid content of ultrasound-assisted ethanolic extracts of medicinal plants. **Measurement**, v. 89, p. 328–332, jul. 2016.

NIEUWENHUYIS, R. The structural, functional, and molecular organization of the brainstem. **Frontiers in neuroanatomy**, v. 5, p. 33, 2011.

NISHI, E. E. et al. Losartan Reduces Oxidative Stress Within the Rostral Ventrolateral Medulla of Rats With Renovascular Hypertension. **American Journal of Hypertension**, v. 26, n. 7, p. 858–865, 1 jul. 2013.

OGAWA, N. et al. A simple quantitative bradykinesia test in MPTP-treated mice. **Research communications in chemical pathology and pharmacology**, v. 50, n. 3, p. 435–41, dez. 1985.

OLUGBAMI, J. O.; GBADEGESIN, M. A.; ODUNOLA, O. A. In vitro free radical scavenging and antioxidant properties of ethanol extract of *Terminalia glaucescens*. **Pharmacognosy research**, v. 7, n. 1, p. 49–56, 2015.

OZCELIK, D. et al. Copper-Mediated Oxidative Stress in Rat Liver. **Biological Trace Element Research**, v. 96, n. 1–3, p. 209–216, 2003.

PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 1, p. 315–424, 1 jan. 2007.

PEACH, M. J. Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. **Physiological reviews**, v. 57, n. 2, p. 313–70, abr. 1977.

PETERSEN, M. et al. Proposed biosynthetic pathway for rosmarinic acid in cell cultures of *Coleus blumei* Benth. **Planta**, v. 189, n. 1, p. 10–14, jan. 1993.

PETERSEN, M. et al. The biosynthesis of rosmarinic acid in suspension cultures of *Coleus blumei*. In: **Primary and Secondary Metabolism of Plants and Cell Cultures III**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1994. p. 171–179.

PETERSEN, M. Cytochrome P450-dependent hydroxylation in the biosynthesis

of rosmarinic acid in Coleus. **Phytochemistry**, v. 45, n. 6, p. 1165–1172, jul. 1997.

PETERSEN, M. et al. Evolution of rosmarinic acid biosynthesis. **Phytochemistry**, v. 70, n. 15–16, p. 1663–1679, out. 2009.

PETERSEN, M.; SIMMONDS, M. S. J. Rosmarinic acid. **Phytochemistry**, v. 62, n. 2, p. 121–5, jan. 2003.

PETERSON, J. R. et al. Genetic Silencing of Nox2 and Nox4 Reveals Differential Roles of These NADPH Oxidase Homologues in the Vasopressor and Dipsogenic Effects of Brain Angiotensin II. **Hypertension**, v. 54, n. 5, p. 1106–1114, 1 nov. 2009.

POPOV, A. M. et al. [Biological activity and mechanisms of therapeutic action of rosmarinic acid, luteolin and its sulphated derivatives]. **Biomeditsinskaia khimiia**, v. 62, n. 1, p. 22–30, 2016.

PORRAS, G.; LI, Q.; BEZARD, E. **Modeling Parkinson's Disease in Primates: The MPTP Model** Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, mar. 2012.

RAHIMI, Z.; MORADI, M.; NASRI, H. **A systematic review of the role of renin angiotensin aldosterone system genes in diabetes mellitus, diabetic retinopathy and diabetic neuropathy** Journal of Research in Medical Sciences: The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences India, nov. 2014.

RANSOM, B. R. et al. Astrocytes convert the parkinsonism inducing neurotoxin, MPTP, to its active metabolite, MPP+. **Neuroscience letters**, v. 75, n. 3, p. 323–8, 10 abr. 1987.

RASCOL, O. et al. Milestones in Parkinson's disease therapeutics. **Movement Disorders**, v. 26, n. 6, p. 1072–1082, maio 2011.

RAŠKOVIĆ, A. et al. Antioxidant activity of rosemary (Rosmarinus officinalis L.) essential oil and its hepatoprotective potential. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 1, p. 225, 7 dez. 2014.

ROZAS, G.; LABANDEIRA GARCÍA, J. L. Drug-free evaluation of rat models of parkinsonism and nigral grafts using a new automated rotarod test. **Brain**

Research, v. 749, n. 2, p. 188–199, 28 fev. 1997.

SALTAS, D. et al. Direct Determination of Rosmarinic Acid in *Lamiaceae* Herbs Using Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy (DRIFTS) and Chemometrics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 13, p. 3235–3241, 3 abr. 2013.

SARSOUR, E. H. et al. MnSOD activity protects mitochondrial morphology of quiescent fibroblasts from age associated abnormalities. **Mitochondrion**, v. 10, n. 4, p. 342–9, jun. 2010.

SCARPATI, M. L.; ORIENTE, G. Isolamento e costituzione dell'acido rosmarinico (dal rosmarinus off.). **Riserva Science**, v. 28, p. 2329–2333, 1958.

SCHAPIRA, A. H. V.; CHAUDHURI, K. R.; JENNER, P. Non-motor features of Parkinson disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 18, n. 7, p. 435–450, 8 jun. 2017.

SCHECKEL, K. A.; DEGNER, S. C.; ROMAGNOLO, D. F. Rosmarinic acid antagonizes activator protein-1-dependent activation of cyclooxygenase-2 expression in human cancer and nonmalignant cell lines. **The Journal of nutrition**, v. 138, n. 11, p. 2098–105, nov. 2008.

SHEKARCHI, M. et al. Comparative study of rosmarinic acid content in some plants of Labiatae family. **Pharmacognosy magazine**, v. 8, n. 29, p. 37–41, jan. 2012a.

SHEKARCHI, M. et al. Comparative study of rosmarinic acid content in some plants of Labiatae family. **Pharmacognosy Magazine**, v. 8, n. 29, p. 37–41, 26 jan. 2012b.

SHIMOJO, Y. et al. Effect of rosmarinic acid in motor dysfunction and life span in a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. **Journal of Neuroscience Research**, v. 88, n. 4, p. NA-NA, mar. 2009.

SILVA, J. P.; GOMES, A. C.; COUTINHO, O. P. Oxidative DNA damage protection and repair by polyphenolic compounds in PC12 cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 601, n. 1–3, p. 50–60, 28 dez. 2008.

SLAMENOVA, D. et al. Rosemary-stimulated reduction of DNA strand breaks and

FPG-sensitive sites in mammalian cells treated with H₂O₂ or visible light-excited Methylene Blue. **Cancer letters**, v. 177, n. 2, p. 145–53, 28 mar. 2002.

SOOK YUN, Y. et al. Phenylpropanoid derivatives from edible canna, *Canna edulis*. **Phytochemistry**, v. 65, n. 14, p. 2167–2171, jul. 2004.

SPARKS, M. A. et al. Classical Renin-Angiotensin system in kidney physiology. **Comprehensive Physiology**, v. 4, n. 3, p. 1201–28, jul. 2014.

TRUJILLO, J. et al. Curcumin prevents cisplatin-induced decrease in the tight and adherens junctions: relation to oxidative stress. **Food & function**, v. 7, n. 1, p. 279–93, jan. 2016.

TSUDA, K. Renin-Angiotensin system and sympathetic neurotransmitter release in the central nervous system of hypertension. **International journal of hypertension**, v. 2012, p. 474870, 2012.

TWELVES, D.; PERKINS, K. S. M.; COUNSELL, C. Systematic review of incidence studies of Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 18, n. 1, p. 19–31, jan. 2003.

UEHARA, S. et al. Activation and deactivation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine by cytochrome P450 enzymes and flavin-containing monooxygenases in common marmosets (*Callithrix jacchus*). **Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals**, v. 43, n. 5, p. 735–42, 1 maio 2015.

VALENTI, V. E. et al. Cardiovascular responses induced by Catalase Inhibitor into the Fourth Cerebral Ventricle is changed in Wistar rats exposed to sidestream cigarette smoke. **International journal of health sciences**, v. 7, n. 2, p. 200–7, jun. 2013.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323–1338, out. 2007.

VERDONK, K.; DANSER, A. H. J.; VAN ESCH, J. H. M. Angiotensin II type 2 receptor agonists: where should they be applied? **Expert Opinion on**

Investigational Drugs, v. 21, n. 4, p. 501–513, 21 abr. 2012.

VIDELA, L. A. Oxidative stress signaling underlying liver disease and hepatoprotective mechanisms. **World journal of hepatology**, v. 1, n. 1, p. 72–8, 31 out. 2009.

VLADIMIROV, I. A. [Free radical lipid oxidation and physical properties of lipid layer of biological membranes]. **Biofizika**, v. 32, n. 5, p. 830–44, 1987.

WANG, J. et al. Neurorescue effect of rosmarinic acid on 6-hydroxydopamine-lesioned nigral dopamine neurons in rat model of Parkinson's disease. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 47, n. 1, p. 113–119, 2012.

WANG, W.-J. et al. Effect of a rosmarinic acid supplemented hemodialysis fluid on inflammation of human vascular endothelial cells. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 50, n. 12, p. e6145, 19 out. 2017.

WEBSTER, N. R.; NUNN, J. F. Molecular structure of free radicals and their importance in biological reactions. **British journal of anaesthesia**, v. 60, n. 1, p. 98–108, jan. 1988.

WU, W.; WANG, Y. Pharmacological actions and therapeutic applications of *Salvia miltiorrhiza* depside salt and its active components. **Acta Pharmacol Sin**, v. 33, n. 9, p. 1119–1130, set. 2012.

ZHANG, Q. et al. Reassessment of subacute MPTP-treated mice as animal model of Parkinson's disease. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 38, n. 10, p. 1317–1328, 26 out. 2017.